Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen
und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof.Dr.H.Th.Brüster)

Transfusionsmedizinische Aspekte HLA-angepaßter Thrombozytensubstitution

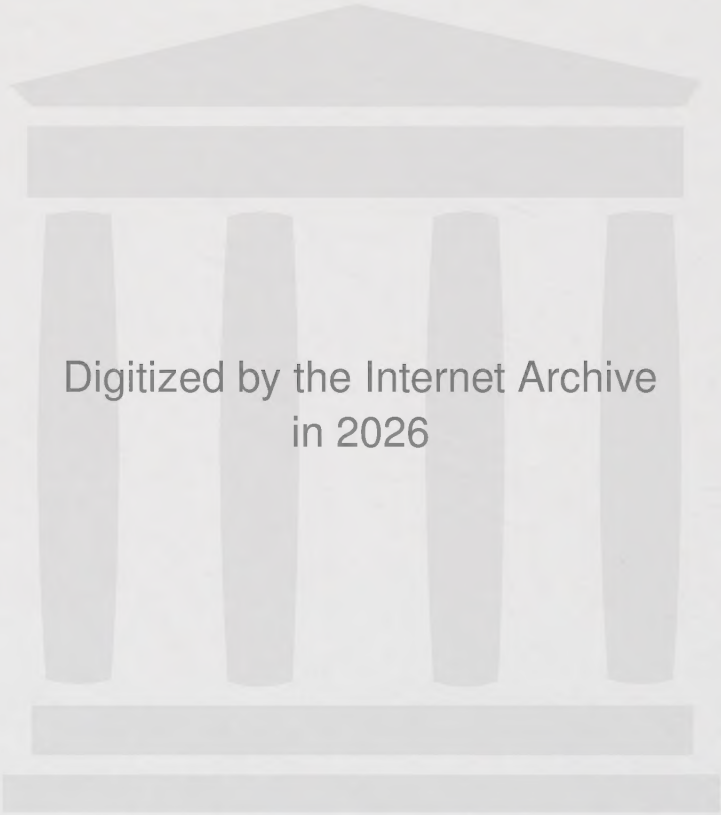
Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Jürgen Wollenhaupt

1983


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0019

Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen
und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof.Dr.H.Th.Brüster)

Transfusionsmedizinische Aspekte HLA-angepaßter Thrombozytensubstitution

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Jürgen Wollenhaupt

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:Prof.Dr.H.Th.Brüster

Referent
gez.:Prof.Dr.H.Th.Brüster

Korreferent
gez.:Prof.Dr.J.Th.Fischer

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Vorwort	1
1.	Einleitung	2
1.1.	Historischer Rückblick	2
1.2.	Thrombozytensubstitution	4
1.2.1.	Prinzip der Zellseparation	7
1.2.2.	Effektivität der Zellseparatorkonzentrate	8
1.2.3.	Problem der Alloimmunisierung	11
1.3.	HLA-System	13
1.3.1.	Grundlagen des HLA-Systems	13
1.3.2.	Bedeutung des HLA-Systems	17
1.3.3.	HLA-System und Thrombozytentransfusion	20
1.4.	Untersuchungsziele	25
2.	Untersuchungen	26
2.1.	Material	26
2.1.1.	Patienten	26
2.1.2.	Spender	30
2.1.3.	Immunologische Spenderauswahl	31
2.1.4.	Zellseparation	33
2.2.	Eigene Untersuchungen	35
2.2.1.	Konzentratuntersuchungen	35
2.2.1.1.	Thrombozyten- und Leukozytenzählung	35
2.2.1.2.	Differentialblutbild	36
2.2.2.	HLA-Antikörpersuche	37
2.2.3.	Lymphozytendifferenzierung	40
2.2.4.	Sonstige Spenderdaten	43
2.2.5.	Spender-Empfänger-Konstellationen	44
3.	Ergebnisse	46
3.1.	Spenderuntersuchungen	46
3.2.	Konzentratuntersuchungen	50
3.3.	Spender-Empfänger-Konstellationen	53

3.4. HLA-Antikörpersuche 61
3.4.1. HLA-Antikörper vor Thrombozytentransfusion 61
3.4.2. HLA-Antikörper nach Thrombozytentransfusion 62
3.4.3. Transfusionsfrequenz und HLA-Antikörper 65
3.4.4. Präsenz des HLA-A2-Antigens 67
3.4.5. HLA-Antikörperspenzifität 68
3.4.6. Immunsuppressive Therapie 69
3.4.7. Vorausgegangene Transfusionen 69
4. Diskussion der Ergebnisse 73
4.1. Spendernebenwirkungen 73
4.2. Untersuchungen der Zellseparatorkonzentrate 80
4.3. Immunologische Spenderauswahl 86
4.4. Ergebnisse der HLA-Antikörpersuche 91
Zusammenfassung 101
Literaturverzeichnis 103

Vorwort

Die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten gilt heute bei stark thrombozytopenischen Patienten als eine effektive Maßnahme zur Verringerung der Frequenz lebensgefährlicher Blutungskomplikationen (DJERASSI et.al.24, FREIREICH et.al.33). Bei polytransfundierten Empfängern derartiger Konzentrate kann eine Immunisierung gegen Spenderantigene, vor allem HLA-Antigene, zum Ausbleiben des Transfusionserfolges führen (YANKEE et.al.95). Für diese Fälle wird heute allgemein auf HLA-angepaßte Spender zurückgegriffen, deren Zellkonzentrate bei Refraktärität des Empfängers gegenüber Konzentraten von nicht HLA-angepaßten Spendern noch effektiv sind (LOHRMANN et.al.56).

Einen weitergehenden, neuen therapeutischen Ansatz stellt der Versuch dar, schon vor der möglichen Entwicklung einer Alloimmunisierung bei der ersten Transfusion von Thrombozytenkonzentraten HLA-angeglichene Spender auszuwählen (SLICHTER 75). Die vorliegende prospektive Untersuchung verfolgt das Ziel, die nach diesem Konzept hergestellten Zellseparator-Konzentrate auf möglicherweise vorhandene Spenderrisiken zu untersuchen und die erreichten Konstellationen von Spendern und Empfängern im HLA-System sowie das Ausmaß der HLA-Antikörperbildung bei den Empfängern zu ermitteln, um den Wert dieser Strategie näher bestimmen zu können.

1. Einleitung

1.1 Historischer Rückblick

Schon frühzeitig suchte die Medizin nach Wegen, Krankheiten mittels Blutbehandlung zu heilen. Beschränkten sich die therapeutischen Versuche im Mittelalter jedoch fast ausschließlich auf den Aderlaß, so eröffnete die Entdeckung des Blutkreislaufes durch HARVEY 1628 neue Möglichkeiten und Denkansätze.

Die Transfusionsmedizin nahm ihren Ausgang von Tierblutübertragungen im 17. Jahrhundert (BOROVICZENY et.al.11). Erste Hinweise auf Versuche der Bluttransfusion finden sich bei MAGNUS PEGEL (1604), ANDREAS LIBAVIUS (1615) und FRANCIS POTTER (1650). Zur gleichen Zeit entwickelte sich der Gedanke, durch Blutübertragung auf den Menschen eine 'Blutverbesserung' zu erzielen und Heilmittel zu infundieren. 1667 führten die Franzosen JEAN DENIS und PAUL EMMEREZ die erste Bluttransfusion von Tierblut auf den Menschen mit therapeutischer Zielsetzung durch. Ihnen folgte

kurze Zeit später der Deutsche MATTHÄUS GOTTFRIED PURMANN. Die erste Transfusion mit menschlichem Blut führte 1825 J. BLUNDELL durch. Wegen der häufig schweren Transfusionszwischenfälle aufgrund der noch unbekannten Blutgruppen wurden Blutübertragungen in der Folgezeit nur in wenigen Fällen durchgeführt.

Die Erkenntnisse der Physiologie Mitte des vorigen Jahrhunderts verlagerten den Schwerpunkt der Blutübertragung von dem Aspekt der Reinigung auf die Möglichkeit des Blutersatzes.

Mit der Entdeckung der Blutgruppen durch den Münchener KARL LANDSTEINER im Jahr 1900 begann der Aufschwung der Transfusionsmedizin (LANDSTEINER et.al.48,49). Landsteiners Entdeckungen bildeten die Basis intensiver Forschungen und ermöglichten eine Risikoverminderung bei der Blutübertragung. Während zu Beginn des 20. Jahrhunderts verschiedene Techniken der direkten Bluttransfusion entwickelt wurden, u.a. auch von dem Deutschen SAUERBRUCH (71), wurde durch die Entdeckung der Ungerinnbarmachung des Blutes durch COOMBS et.al. (19) die eigentliche Voraussetzung zur indirekten Transfusion und die Einrichtung von Blutbanken geschaffen.

E.J. COHN schließlich entwickelte die Technik der Alkoholfraktionierung und ermöglichte durch die Zerlegung des Blutplasmas in gerinnungsaktive Plasmabestandteile die gezielte Transfusion einzelner Blutbestandteile (COHN et.al.18).

Die heutige Transfusionsmedizin vermag einzelne Blutbestandteile in Form von Erythrozytenkonzentraten, Plasmafraktionen, darunter Gerinnungsfaktoren, und auch Thrombozyten- und Leukozytenkonzentraten gezielt zu substituieren.

Auf die Thrombozytensubstitution soll nun näher eingegangen werden.

1.2 Thrombozytensubstitution

Thrombozyten haben die Aufgabe, die morphologische und funktionelle Integrität des Gefäßsystems aufrechtzuerhalten. Sie sind die zellulären Elemente der physiologischen Blutstillung und sind beteiligt an der Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssytems sowie an der primären Blutgerinnung.

Die Freisetzung des Plättchenfaktors III nach Reaktion der Thrombozyten mit Endothelstrukturen führt zur Aktivierung des Faktors X und zur Umwandlung von Prothrombin in Thrombin, das wiederum notwendig ist für die Funktion der Thrombozyten bei der Aggregation und der Bildung des hämostatischen Fibrinpfropfes.

Das Ausmaß der Blutgerinnung hängt u.a. von der Anzahl zirkulierender Thrombozyten ab. Bei zu geringer Thrombozytenzahl sind die Bildung des hämostatischen Pfropfes und der plasmatische Gerinnungsvorgang gestört, sodaß es zu verstärkter Blutungsneigung und einer Verlängerung der Blutungszeit kommt (MIELKE et.al.62). Bei Thrombozytenkonzentrationen unter 20.000/mm³ ist die Inzidenz schwerer Blutungskomplikationen signifikant erhöht (GAYDOS et.al.34).

Bereits im Jahre 1900 äußerte DUKE die Vermutung, daß Patienten mit Blutungsstörungen durch Bluttransfusion erfolgreich therapiert werden könnten (DUKE, 26). In den 50er Jahren erfolgten erste Untersuchungen zu den Auswirkungen der Transfusion von Thrombozyten durch CRONKITE et.al. (20) und

DILLARD et.al. (23), wobei die Thrombozytentransfusion jedoch in erster Linie als diagnosticher Ansatz zur Erforschung der Mechanismen der Thrombozytopenie, nicht aber therapeutischen Zielen diente. Sie lieferten Hinweise darauf, daß die Transfusion von Thrombozyten das Auftreten der durch Thrombozytopenie hervorgerufenen Blutungskomplikationen verhindern könnte. In der Folge erhielten thrombozytopenische Patienten Plättchenanreicherungen, die durch Zentrifugation und Behandlung mehrerer Vollblutkonserven gewonnen wurden.

Ein großer Fortschritt war die Entwicklung verschiedener Zellseparatoren durch DJERASSI et.al. (25), GRAW et.al. (36) und TULLIS et.al. (88). Sie ermöglichten erstmals die Zerlegung des Blutes während der Spende und die Gewinnung hochkonzentrierter Thrombozyten- und Leukozytenpräparationen.

1.2.1 Prinzip der Zellseparation

Diese Zellseparatoren arbeiten mit unterschiedlichen Verfahren. Ihnen liegt jedoch ein gemeinsames Prinzip zugrunde.

Das Blut des Spenders wird nicht mehr direkt in einem Sammelbeutel aufgefangen, sondern zunächst dem Zellseparator zugeführt, der durch geeignete Verfahren das gewonnene Blut in Plasma, rote Zellen, weiße Zellen und Blutplättchen auftrennt. Der gewünschte Blutbestandteil wird in einem Beutel gesammelt, während die restlichen Bestandteile dem Spender retransfundiert werden. Es besteht also die Möglichkeit, die im Verhältnis zu Erythrozyten und Plasma schwerer zu gewinnenden Thrombozyten und Leukozyten durch Erhöhung der Menge prozessierten Blutes anzureichern.

Die Zellseparatoren selbst arbeiten unter Nutzung verschiedener Bluteigenschaften. Bei der Filtrationsleukapherese (DJERASSI et.al.25) werden die Zellen aufgrund ihrer Größe und Adhäsionskräfte in verschiedenen Nylonfiltern aufgefangen und angereichert.

Demgegenüber arbeitet die Durchfluß-Leukapherese nach dem Zentrifugationsprinzip. Das Blut wird in eine glockenförmig gestaltete Zentrifuge geleitet, in der sich die einzelnen Blutbestandteile entsprechend ihrer verschiedenen Sedimentationseigenschaften in verschiedenen Schichten anreichern. Der Zentrifugeninhalt wird entweder bei kontinuierlichem Zufluß -Kontinuierlich Fließende Leukapherese, CFL, (GRAW et.al.36)- oder intermittierend -Intermittierend Fließende Leukaphrese, IFL, (TULLIS et.al.88)- durch besonders angeordnete Schleusen aus verschiedener Höhe der Zentrifuge in einen Sammelbeutel geleitet. Dieser enthält nach Abschluß der Prozedur weitgehend selektiv die gewünschte Zellart in hohen Konzentrationen.

1.2.2 Effektivität der Zellseparatorkonzentrate

Die klinische Effektivität der Transfusion von Zellseparatorkonzentraten gilt heute als gesichert. DJERASSI et.al. (24) gelang erstmals der Nachweis, daß die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten für thrombozytopenische Patienten zu einer signifikanten Minderung der Frequenz lebens-

gefährlicher Blutungen führt. Weitere Studien von FREIREICH (33) und BOSCH et.al. (12) bestätigten, daß die Transfusion von Plättchenkonzentraten der oben beschriebenen Separationsmethoden beim Empfänger zu einem wirksamen Anstieg der Thrombozytenzahlen und zu einer signifikanten Verkürzung der Blutungszeit führt.

Die klinische Wirksamkeit der Thrombozytentransfusion wird durch die Erfüllung folgender Bedingungen gewährleistet.

Voll funktionsfähige Thrombozyten haben eine mittlere Halbwertzeit von 9 bis 10 Tagen, sind aber lediglich über einen Zeitraum von 4 bis 5 Tagen hämostatisch effektiv, da sie während der Zirkulation einem Alterungsprozeß unterliegen (ASTER 5). Außerdem befinden sich nur zwei Drittel der Plättchen in Zirkulation, während der Rest in einem frei austauschbaren Milzpool verbleibt (JANDL et.al.43).

Daraus ergeben sich hinsichtlich der Dosierung hohe Anforderungen an eine effektive Thrombozytensubstitution. Unter steady-state-Bedingungen ist für thrombozytopenische Patienten die Transfusion

von durchschnittlich 0.5 bis $1 \cdot 10^{11}$ Thrombozyten/die zu fordern, um eine adäquate Hämostase zu gewährleisten (GRUMET et.al.38, LOHRMANN et.al.56).

Diese Thrombozytendosen können mit allen zur Verfügung stehenden Zellseparations-Methoden gewonnen werden (DJERASSI et.al.25;GRAW et.al.36; TULLIS et.al.88).

Der Transfusionserfolg ist nicht nur abhängig von einer ausreichenden Thrombozytendosis, sondern auch von der Funktionsfähigkeit der transfundierten Zellen im Empfängerorganismus.

SLICHTER (76) zeigte, daß die gesammelten Thrombozyten über eine normale Vitalität und Funktionsfähigkeit verfügen. Lagerung bei Raumtemperatur und Transfusion innerhalb von 24 Std. erhält diese funktionelle Integrität (MURPHY et.al.65).

Die gesammelten Plättchen sollten jedoch möglichst bald transfundiert werden, da Lagerung über 48 Std. hinaus zu einem verringerten Thrombozytenanstieg beim Empfänger führt (LEVIN et.al.53).

ABRAHAMSEN (1) konnte zeigen, daß mit Ausnahme der seltenen hereditären Thrombozytopenien die Funktionsfähigkeit und Überlebenszeit transfundierter allogener Thrombozyten identisch ist mit derjenigen autologer Thrombozyten.

Bei thrombozytopenischen Patienten kommt es post transfusionem im Mittel zu einem Thrombozytenanstieg um 56% der Zahl transfundierter Plättchen (SLICHTER et.al.77). Da etwa ein Drittel der Plättchen sofort nach der Transfusion in der Milz abgefangen werden, entspricht dies einem uneingeschränkten Transfusionserfolg (JANDL et.al.43).

Eine Erniedrigung des Thrombozytenanstieges wird jedoch beobachtet bei Fieber, Infektion oder Alloimmunisation der Empfänger (GRUMET et.al.38).

1.2.3 Problem der Alloimmunisierung

Die Applikation von Thrombozytenkonzentraten hat für den Empfänger immunologische Konsequenzen.

Erstens birgt die Transfusion einer großen Anzahl von Lymphozyten in den Konzentraten bei gleichzeitigem Immundefizit eines leukopenischen Empfän-

gers das Risiko der Entwicklung einer graft-versus-host-Reaktion (NUSBACHER et.al.66). Zur Vermeidung dieser Komplikation ist eine Bestrahlung der Thrombozytenkonzentrate unter Megavolt-Bedingungen üblich geworden.

SVEJGAARD gelang der Nachweis, daß Thrombozyten Antigene des Haupt-Histokompatibilitätssystems des Menschen, HLA, tragen (SVEJGAARD et.al.82). Die Transfusion von Spenderzellen, die sich von den Empfängerzellen hinsichtlich der HLA-Antigene unterscheiden, kann zur Bildung zytotoxischer Antikörper führen (DAUSSET 22). TEJADA et.al. (84) zeigten als erste, daß die wiederholte Transfusion von Zellseparatorkonzentraten zur Immunisierung des Empfängers gegen HLA-Antigene führen kann.

Trotz der vollen in-vitro-Funktionsfähigkeit der Thrombozyten und ausreichender Transfusionsdosen war nach diesen Untersuchungen bei einigen Patienten kein Transfusionserfolg, gemessen am Thrombozytenanstieg post transfusionem und einer Blutungszeitverkürzung, zu erzielen.

Die Präsenz lymphozytotoxischer Antikörper im Empfängerorganismus führte zu einer verkürzten Lebenszeit und signifikant vermindertem Thrombozytenanstieg nach der Transfusion.

Vor einer näheren Erläuterung der Zusammenhänge zwischen HLA-System und Thrombozytentransfusion soll zunächst ein kurzer Überblick über das Haupthistokompatibilitätssystem des Menschen, HLA, gegeben werden.

1.3 HLA-System

1.3.1 Grundlagen des HLA-Systems

Das HLA-System (Human Leukocyte Antigen - System) besteht aus einer Gruppe von Histokompatibilitätsantigenen, die genetisch determinierte Zelloberflächenstrukturen darstellen und auf allen menschlichen Zellen anwesend sind (SVEJGAARD 81).

Innerhalb des HLA-Systems unterscheidet man fünf Hauptgruppen, die HLA-A-, HLA-B-, HLA-C-, HLA-D- und HLA-DR-Antigene. Jedes Individium besitzt auf seinen Zellen je zwei Antigene der Gruppen A, B und C (BIALEK et.al.9, BERAH et.al.8), die durch serologische Verfahren identifiziert werden können (serologic detectable, SD) (VAN ROOD 89, PAYNE et.al.69). Die HLA-D-Antigene sind vornehmlich auf B-Lymphozyten und Monozyten anwesend (BACH et.al.7) und werden durch ein besonderes Verfahren, die gemischte Lymphozyten-Kultur (MLC), identifiziert. Die HLA-DR-Gene kodieren ebenfalls B-Lymphozyten-Antigene (VAN LEEUWEN et.al.52). Ihre Bedeutung ist derzeit noch nicht genau bekannt.

Die HLA-Antigene werden duch Genloci auf dem Chromosom Nr. 6 kontrolliert. Der Erbgang ist kodominant (BREUNING et.al.13). In etwa 1% der meiotischen Teilungen wird ein Crossing-Over zwischen A- und B-Locus beobachtet, während in den übrigen Fällen die auf dem gleichen elterlichen Chromosom anwesenden A-, B- und C-Antigene 'en bloc' an die Kinder als HLA-Haplotyp vererbt werden (CEPPELINI et.al.16).

Durch die Beobachtung des HLA-Haplotypes in großen Populationen hat man ein Kopplungsungleichgewicht festgestellt (ALBERT et.al.4, HILLER et.al.41): Ein Allel auf einem Locus erscheint im gleichen Haplotyp öfter gemeinsam mit einem oder mehreren Allelen eines anderen Locus als mit anderen Genen dieses Locus. Zum Beispiel erscheinen HLA-A1 und HLA-B8 etwa zehn mal häufiger gemeinsam als zu erwarten wäre, wenn es ein Bindungsgleichgewicht und somit keine Assoziation zwischen ihnen gäbe (ALBERT et.al.4). Dieses Phänomen, dessen Ursache noch ungeklärt ist, existiert für praktisch alle HLA-A-, -B- und -C-Allele.

Für jede Hauptgruppe der HLA-Antigene existiert in der Bevölkerung eine große Zahl multipler Allele. Die folgende Tab.1 zeigt die 1980 vom 8. Histocompatibility Workshop herausgegebene offizielle Liste definierter Spezifitäten, die noch nicht als endgültig und vollständig angesehen werden kann, da aufgrund verbesserter Technik immer noch neue Antigene definiert werden können (ALBERT et.al.4).

Tab.1 Komplette Liste anerkannter HLA-Spezifitäten

HLA-A	HLA-B		HLA-C	HLA-D	HLA-DR
HLA-A1	HLA-B5	HLA-Bw45(12)	HLA-Cw1	HLA-Dw1	HLA-DR1
HLA-A2	HLA-B7	HLA-Bw46	HLA-Cw2	HLA-Dw2	HLA-DR2
HLA-A3	HLA-B8	HLA-Bw47	HLA-Cw3	HLA-Dw3	HLA-DR3
HLA-A9	HLA-B12	HLA-Bw48	HLA-Cw4	HLA-Dw4	HLA-DR4
HLA-A10	HLA-B13	HLA-Bw49(w21)	HLA-Cw5	HLA-Dw5	HLA-DR5
HLA-A11	HLA-B14	HLA-Bw50(w21)	HLA-Cw6	HLA-Dw6	HLA-DRw6
HLA-Aw19	HLA-B15	HLA-Bw51(5)	HLA-Cw7	HLA-Dw7	HLA-DR7
HLA-Aw23(9)	HLA-Bw16	HLA-Bw52(5)	HLA-Cw8	HLA-Dw8	HLA-DRw8
HLA-Aw24(9)	HLA-B17	HLA-Bw53		HLA-Dw9	HLA-DRw9
HLA-A25(10)	HLA-B18	HLA-Bw54(w22)		HLA-Dw10	HLA-DRw10
HLA-A26(10)	HLA-Bw21	HLA-Bw55(w22)		HLA-Dw11	
HLA-A28	HLA-Bw22	HLA-Bw56(w22)		HLA-Dw12	
HLA-A29	HLA-B27	HLA-Bw57(17)			
HLA-Aw30	HLA-Bw35	HLA-Bw58(17)			
HLA-Aw31	HLA-B37	HLA-Bw59			
HLA-Aw32	HLA-Bw38(w16)	HLA-Bw60(40)			
HLA-Aw33	HLA-Bw39(w16)	HLA-Bw61(40)			
HLA-Aw34	HLA-B40	HLA-Bw62(15)			
HLA-Aw36	HLA-Bw41	HLA-Bw63(15)			
HLA-Aw43	HLA-Bw42	HLA-Bw4			
	HLA-Bw44(12)	HLA-Bw6			

Aus:Albert E et. al.,Nomenclature for Factors of the HLA System 1980 (3)

Die Vielzahl verschiedener Antigene führt zu einer großen Kombinationsmöglichkeit und somit zu einer geringen Frequenz eines einzelnen HLA-Haplotyps in einer Population.

So weisen z.B. die häufigsten HLA-Phänotypen in der europäischen Bevölkerung HLA-A1; -A3; -B7; -B8; -C- oder HLA-A1; -A2; -B8; -B12; -C- nur Frequenzen von ca. 0.7 % (= 7/1000) auf (MAYR 61).

Ferner bestehen in Abhängigkeit von Rassezugehörigkeit, geographischer Lage und Population Unterschiede der Genfrequenzen, die die Wahrscheinlichkeit eines bestimmten HLA-Phänotypes mitbestimmen (ALBERT et.al.4).

1.3.2 Bedeutung des HLA-Systemes

Die große Bedeutung des HLA-Systemes für die Immunologie kann an dieser Stelle nur angedeutet werden. Die Anwesenheit der HLA-Antigene auf fast allen Gewebszellen bestimmt die Auseinandersetzung eines Organismus mit als fremd erkannten Zellen. Das HLA-System ist damit beteiligt an der genetischen Steuerung der Immunantwort.

Für die Entdeckung des HLA-Systems als Haupt-Histokompatibilitätssystem des Menschen und der damit verbundenen Regulationsmechanismen des Immunapparates wurden im Jahr 1979 die drei Histokompatibilitätsforscher GEORGE SNELL, BARUCK BENACERRAF und JEAN DAUSSET mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt.

Eine überragende Bedeutung kommt dem HLA-System in der Transplantationsimmunologie zu. Nach Arbeiten von VAN ROOD et.al. (93) ist das HLA-System maßgeblich an der Toleranz- bzw. Abstoßungsreaktion eines Organismus gegenüber einem Allotransplantat beteiligt. Die Übereinstimmung von Spendern und Empfängern in den HLA-Antigenen führt zu einer signifikant längeren Überlebenszeit des Transplantates im Vergleich zu nicht-HLA-identischen Transplantaten (THOMAS et.al.86). Dies führte dazu, daß heute vor einer geplanten Organtransplantation die HLA-Antigene der Zellen des Spenderorgans typisiert werden; die auf internationaler Ebene arbeitende EUROTRANSPLANT-Zentrale in Leiden/NL sucht dann aus einer großen Zahl bereits HLA-typisierter möglicher Empfänger den hinsichtlich der Histokompatibilitätsantigene bestangeglichenen Empfänger aus. Mit Hilfe dieser Strategie konnte z.B. die Frequenz von Abstoßreaktionen nach Nierentransplantation signifikant gesenkt werden.

Desweiteren haben zahlreiche Untersuchungen ergeben, daß für eine Reihe verschiedenartiger Erkrankungen eine signifikante Assoziation mit einem

oder mehreren bestimmten HLA-Antigenen besteht (RYDER et.al.70). So tragen beispielsweise Patienten mit dem HLA-Antigen HLA-B27 ein relatives Risiko von 90, an einer Ankylosierenden Spondylitis (M. BECHTEREW) zu erkranken, während die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei nicht HLA-B27-Trägern normal ist (RYDER et.al.70).

Die genauere Kenntnis dieses Zusammenhangs zwischen Krankheitsdisposition und Histokompatibilitätssystem könnte zu einem neuen Verständnis von Krankheitsentstehung und Heilung führen.

Daneben kann der HLA-Phänotyp bei Paternitätsgutachten zum Vaterschaftsausschluß aufgrund seines Polymorphismus mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit herangezogen werden (MAYR 59, 60).

Ähnliche Bedeutung wie für die Transplantation von Organen kommt dem HLA-System auch bei der Transfusion von Zellseparatorkonzentraten zu.

1.3.3 HLA-System und Thrombozytentransfusion

Die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten birgt das Risiko einer Immunisierung des Empfängers gegen antigene Determinanten der Spenderzellen. Die Präsenz zytotoxischer Antikörper im Empfängerorganismus führt zur Refraktärität, d.h. zur Zerstörung der transfundierten Zellen und zum Ausbleiben eines Transfusionseffektes (TEJADA et.al.84).

LOHRMANN et.al. (56) konnten nachweisen, daß die Alloimmunisierung eines Empfängers nach Transfusion von Zellseparatorkonzentraten vorwiegend auf der Bildung lymphozytotoxischer Antikörper gegen HLA-Antigene der Spenderzellen beruht.

Daneben tragen Thrombozyten auch plättchenspezifische Antigene, deren Identifizierung als erstem SHULMAN et.al. (73) gelang. Die Bildung von Antikörpern gegen diese plättchenspezifischen Antigene kann zur Thrombopenie führen, die die Transfusion von Thrombozyten erforderlich macht, welche das entsprechende Antigen nicht tragen.

Meist handelt es sich dabei um das PLA^{-1}-Antigen, das von 97 % der Bevölkerung geteilt wird (SHULMAN et.al.73). Für die Immunisierung nach Thrombozytentransfusionen sind plättchenspezifische Antigene jedoch äußerst selten verantwortlich (LOHRMANN et.al.56).

Durch Studien mit ^{51}cr-markierten Thrombozyten demonstrierten MITTAL et.al. (63), daß die Übereinstimmung von Spender und Empfänger in den HLA-Antigenen und die Abwesenheit lymphozytotoxischer Antikörper im Empfängerserum die Überlebenszeit transfundierter Thrombozyten signifikant verlängern. Demgegenüber waren bei Empfängern HLA-inkompatibler Thrombozyten Überlebenszeit und Plättchenanstieg post transfusionem signifikant herabgesetzt.

Ferner führt nach Untersuchungen von HERZIG et.al. (40) die Transfusion HLA-inkompatibler Thrombozytenkonzentrate zu einem prolongierten Abfall der zirkulierenden Granulozyten, während HLA-angeglichene Plättchentransfusionen keine Granulopenie verursachen. Außerdem prädisponiert die Präsenz von Leukozyten-Antikörpern für Transfusionskomplikationen verschiedenen Schweregrades (GOLDSTEIN et.al.35).

Ein weiterer Fortschritt in der Thrombozytentransfusion gelang YANKEE et.al. (95) durch die Erkenntnis, daß die Transfusion von Thrombozyten HLA-identischer Zwillinge bei Empfängern, die gegenüber Zellseparatorkonzentraten von Normalspendern bereits refraktär waren, erneut zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl und einer Besserung des klinischen Bildes führte.

In weiteren Studien zeigten YANKEE et.al. (94) und HERZIG et.al. (39), daß auch Thrombozytenkonzentrate HLA-kompatibler, aber nicht verwandter Spender bei immunisierten, refraktären Patienten erneut effektiv sind.

Nähere Untersuchungen zum Immunisierungsmechanismus durch DUQUESNOY et.al. (28) zeigten, daß insbesondere die HLA-A- und HLA-B-Merkmale für die Bildung lymphozytotoxischer Antikörper verantwortlich sind.

Die HLA-C-Antigene konnten zwar auf Thrombozyten nachgewiesen werden, sind aber an den Immunisierungsreaktionen nach Thrombozytentransfusionen nicht beteiligt (DUQUESNOY et.al.28). HLA-D- und

HLA-DR-Antigene sind auf Thrombozyten nicht nachgewiesen worden (VAN ROOD et.al.91).

In weiteren Studien fanden DUQUESNOY et.al. (29), daß nicht nur HLA-identische Spenderzellen bei alloimmunisierten Patienten effektiv sind, sondern daß auch durch Spender-Empfänger-Konstellationen, in denen der Spender kreuzreagierende Antigene führt, der Transfusionseffekt wieder erreicht werden kann. Darunter versteht man Gruppen von Antigenen eines Locus, deren antigene Determinanten sich ähneln bzw. teilweise identisch sind. Aufgrunddessen werden Sensibilisierungsreaktionen zwischen Antigenen einer Gruppe seltener beobachtet als zwischen nicht kreuzreagierenden Antigenen.

Das Ausmaß der Immunisierung nach Transfusion von Plättchen, die im HLA-System mehrere Mismatches zeigten, war jedoch unterschiedlich. DUQUESNOY fand, daß Empfänger, die zur Vermeidung einer Immunisierungsreaktion unbedingt HLA-identische Spenderzellen benötigten, signifikant gehäuft Träger des HLA-A2-Antigens waren. Dagegen waren Empfänger, die gut auf schlechter angeglichene Zellen reagierten, signifikant gehäuft

Nicht-HLA-A2-Antigenträger. Ferner gibt es Hinweise, daß einige auf Thrombozyten vorkommende HLA-A- und -B-Antigene eine unterschiedlich starke Expressivität zu besitzen scheinen (ASTER et.al.6, DUQUESNOY et.al.29, LIEBERT et.al.54). Durch weitere Erforschung der relativen Expressivität und Immunogenität der HLA-Antigene auf Thrombozyten könnten in Zukunft genauere Kenntnisse über die benötigten Spender-Empfänger-Konstellationen bei Plättchentransfusionen gewonnen werden.

Die Immunologische Spenderauswahl nach dem HLA-System mit dem Ziel einer größtmöglichen Übereinstimmung von Spender und Empfänger im Hinblick auf die HLA-A- und HLA-B-Antigene gilt derzeit als bestmöglicher Weg, eine Effektivität der Thrombozytentransfusion für alloimmunisierte, refraktäre Patienten zu erzielen (FILIP et.al.32). Im Gegensatz zu diesen Empfehlungen, die immunologische Spenderauswahl erst nach Entwicklung einer refraktären Phase durchzuführen, wurde an der Blutbank der Universität Düsseldorf der Versuch unternommen, durch frühzeitige Beachtung der HLA-Merkmale des Empfängers und die Verwendung HLA-angeglichener Spender bereits bei der ersten Trans-

fusion von Zellseparatorkonzentraten die Sensibilisierung der Empfänger gegen HLA-Antigene zu vermindern und der Alloimmunisierung mit Entwicklung einer Refraktärität vorzubeugen.

1.4 Untersuchungsziele

Die vorliegende Untersuchung verfolgt das Ziel,

1. den Grad der Kompatibilität von Spender und Empfänger im HLA-System bei dem an der Blutbank der Universität Düsseldorf durchgeführten Spenderauswahlverfahren zu ermitteln,

2. mögliche Spenderrisiken bei der Zellseparation mit dem Haemonetics Modell 30 Zellseparator in Bezug auf Blutbildveränderungen unter besonderer Beachtung des Verhältnisses von B-Lymphozyten zu T-Lymphozyten zu erkennen,

3. das Ausmaß einer Sensibilisierung gegen HLA-Spender-Antigene bei Empfängern von Zellseparatorkonzentraten zu quantifizieren.

2. Untersuchungen

2.1 Material

2.1.1 Patienten

Im Untersuchungszeitraum von 18 Monaten erhielten insgesamt 72 Patienten der Universitätskliniken Düsseldorf Zellseparatorkonzentrate. Alle 72 Patienten wurden in die Studie aufgenommen.

Die Indikation zur Transfusion von Thrombozytenkonzentraten war durch die Mitarbeiter des Instituts für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin überprüft worden.

Die Patienten litten an einer Thrombopenie mit weniger als 7.000 Thrombozyten/mm³ bei verlängerter Blutungszeit und manifester Blutungsneigung und/oder unter einer Granulopenie mit weniger als 500 Zellen/mm³ bei septischem Krankheitsbild und Antibiotikaresistenz. Eine Gerinnungsstörung durch Faktor-XIII-Mangel war ausgeschlossen worden.

Damit erfüllten alle Patienten die Indikationen zur Transfusion von Thrombozytenkonzentraten. Eine Kontraindikation lag nicht vor (Tab. 2).

Tab. 2
Transfusion von Zellseparatorkonzentraten

Indikationen
Thrombopenie unter 7.000/mm³
Verlängerte Blutungszeit
Manifeste Blutungsneigung
Ausgeschlossene Gerinnungsstörung anderer Ursache
oder
Granulopenie unter 500/mm³
Septisches Bild
Antibiotikaresistenz

Kontraindikationen
Prophylaktische Gaben
Dauersubstitution
Verwandtenspender bei geplanter Knochenmarkstransplantation
Schocklunge
Verbrauchskoagulopathien

Die extreme Thrombo/Granulopenie war einerseits Ausdruck einer Erkrankung der blutbildenden Organe, andererseits Folge aggressiver zytostatischer Therapie maligner Tumoren mit Entwicklung einer sekundären Blutbildungsstörung. Die folgende Tab.3 gibt einen Überblick über die Primärerkrankungen der Patienten.

Tab. 3
Krankheiten der Empfänger von Zellseparatorkonzentraten

Diagnose	n	%
Leukämien	38	52.8
ALL	15	20.8
AML	15	20.8
CML	8	11.2
Andere hämatol. Erkrankungen	19	26.4
Idiopath. Thrombopenie	11	15.2
Aplastische Anämie	3	4.2
Agranulocytose	2	2.8
Panmyelopathie	1	1.4
Granulomatose	1	1.4
M.Werlhof	1	1.4
Sonstige Erkrankungen	15	20.8
Non-Hodgkin-Lymphom	4	5.4
Osteosarkom	3	4.2
Wilms-Tumor	2	2.8
Plasmocytom	1	1.4
Teratom	1	1.4
Malignes Melanom	1	1.4
Synovialom	1	1.4
Neuroblastom	1	1.4
Histiocytom	1	1.4
	72	100.0

Zur Vorbereitung der Transfusion waren bei den Patienten Blutgruppenzugehörigkeit im ABO- und Rhesus-System sowie der HLA-Phänotyp durch den standardisierten Mikrolymphozytotoxizitätstest nach der N-I-H-Methode (TERASAKI et.al.85) bestimmt. In Tab.4 sind die HLA-Phänotypen der Patienten aufgeführt.

Tab. 4 HLA-Phänotypen der Patienten

Nº.	Patient	Diagnose	HLA-Phänotyp
1	A.,S.	ALL	W24, W30/31, 15, W35
2	A.,A.	Aplast.Anämie	2, W24, W21, 40
3	A.,W.	Thrombopenie	1, 11, 15.1, 40
4	B.,S.	Agranulocytose	3, 30/31, 5, 7
5	B.,S.	ALL	1, 2, 8, 17
6	B.,S.	Non-Hodgkin-Lymphom	2, W24, 7
7	B.,H.	Mäl. Melanom	W32, W24, W49, 5
8	B.,M.	ALL	11, W24, 5, W44
9	C.,O.	ALL	1, 2, 5, 40
10	D.,E.	CML	2, 28, 5, 18
11	D.,W.	Aplast.Anämie	1, 26, 8, W38
12	D.,E.	ALL	9, 11, 7, W35
13	D.,A.	AML	1, W24, 13, 27
14	E.,C.	Thrombopenie	3, 11, 7, 17.1
15	F.,F.	Teratom	2, 30/31, 5, 40
16	F.,H.	CML	2, 10, W44, W22.1
17.	F.,M.	AML	2, 26, 15, W49
18	F.,M.	AML	11, W44, 18
19	G.,N.	Thrombopenie	W24, 29, 17, W39
20	G.,H.	Thrombopenie	11, W24, W22, W44
21	G.,M.	Osteosarkom	1, 2, 8, 40.2
22	G.,J.	Osteosarkom	2, W31, 7, W39
23	G.,M.	CML	2, 26, 17, W22
24	H.,J.	Synoviom	1, W30, W41, W35
25	H.,J.	Wilms-Tumor	1, 2, 5, 7
26	H.,V.	Thrombopenie	1, 9, W44, 8
27	H.,P.	AML	2, 17
28	H.,H.	CML	2, 30, 13, 15.1
29	H.,S.	Panmyelopathie	2, 25, 18, W41
30	J.,S.	CML	1, 2, 7, W22
31	J.,A.	Thrombopenie	2, 3, W44, W35
32	K.,N.	ALL	3, 24, 8, W41
33	K.,T.	ALL	1, 11, W35, 37
34	K.,C.	M. Werlhof	1, 3, 27, W35
35	K.,J.	Granulomatose	2, 3, W35, 14
36	K.,H.	AML	11, W30/31, W35

Nº.	Patient	Diagnose	HLA-Phä
37	K.,J.	ALL	2, 3, 7
38	K.,S.	Wilms-Tumor	1, 2, 8
39	K.,R.	Aplast.Anämie	1, W32,
40	L.,S.	ALL	2, 29,
41	L.,A.	AML	1, 2, 8
42	L.,B.	AML	1, 9, 8
43	L.,D.	Non-Hodgkin-Lymphom	3, 10,
44	M.,R.	Osteo-Sarkom	2, W44,
45	M.,R.	AML	2, W44,
46	M.,S.	Neuroblastom	2, 29,
47	M.,L.	Thrombopenie	1, W32,
48	M.,H.	Thrombopenie	2, W24,
49	M.,M.	Thrombopenie	2, W24,
50	N.,J.	ALL	W23, 28,
51	N.,R.	CML	2, 3, 1
52	O.,J.	CML	3, 29, 5
53	O.,W.	Plasmocytom	2, W44,
54	R.,T.	ALL	1, 8, W4
55	S.,R.	AML	2, W39,
56	S.,J.	AML	2, 3, 7,
57	S.,R.	AML	1, 2, 7,
58	S.,K.	Histiocytom	2, W30,
59	S.,M.	Thrombopenie	W24, W44
60	S.,W.	AML	3, W53
61	S.,L.	CML	1, 11, 8
62	S.,A.	ALL	2, 3, 5,
63	S.,M.	ALL	1, W32,
64	S.,M.	Agranulocytose	10, 28,
65	T.,S.	AML	2, 3, 7,
66	T.,M.	ALL	2, W24,
67	U.,U.	ALL	9, 11, W
68	W.,L.	Thrombopenie	3, W24, 7
69	W.,L.	Non-Hodgkin-Lymphom	29, 40.2
70	W.,W.	AML	28, 11, 7
71	W.,F.	Non-Hodgkin-Lymphom	3, W23, 5
72	Y.,A.	AML	2, 26, 40

2.1.2 Spender

Zur Spenderauswahl stand ein Pool von anfänglich 600 HLA-typisierten Normalspendern der Blutbank der Universität Düsseldorf zur Verfügung, der im Laufe der Untersuchung monatlich um 50 Spender erweitert wurde und am Ende des Untersuchungszeitraumes 1.400 Spender umfaßte.

Alle Spender waren vor ihrer Aufnahme in den Pool durch die ärztlichen Mitarbeiter der Blutbank Düsseldorf einer eingehenden Erstuntersuchung unterzogen worden. Neben gezielter Anamnese, körperlicher Untersuchung und Thorax-Röntgen umfaßte sie die Bestimmung von Blutbild (Coulter Counter, Coulter Electronics, Hialeah USA), SGPT (Optimierte Standardmethode, Boehringer Mannheim), HBsAg (STUTE et.al.80) und Lues-Serologie (TPHA-Test). Die Spender unterlagen dem von der Blutbank praktizierten Prinzip der Kontrollierten Dauerüberwachung: Vor jeder Spende wurden Blutbild-; SGPT-, HBsAg- und TPHA-Bestimmungen durchgeführt.

Die Erfüllung der unten in Tab.5 aufgeführten Kriterien hätte zum sofortigen Ausschluß eines Spenders aus dem Pool geführt.

Tab. 5
Spenderuntersuchungen vor jeder Blutspende

Parameter	Ausschlußkriterium
Hämoglobin	< 12.9 g/dl
SGPT	> 25 U/l
TPHA	positiv
HbsAg	positiv

Die in den Pool aufgenommenen Spender waren im standardisierten Mikrolymphozytotoxizitätstest nach der N-I-H-Methode (TERASAKI et.al.85) HLA-typisiert.

2.1.3 Immunologische Spenderauswahl

Die Auswahl der Spender für die Zellseparation erfolgte durch die Mitarbeiter des HLA-Labors mit dem Ziel einer größtmöglichen Übereinstimmung von Spender und Empfänger im HLA-Phänotyp.

Die HLA-A- und HLA-B-Antigene des Empfängers wurden mit den Antigenen der in den Pool aufgenommenen Spender verglichen. Entsprechend den in Tab.6 dargestellten Auswahlkriterien wurden zunächst HLA-identische Spender gesucht.

Tab. 6
Auswahlkriterien der Immunologischen Spenderauswahl

Rang	HLA-Konstellationen	Mismatch(es)
I	Full-house-Identität	0
II	3 der 4 Antigene identisch	1
III	HLA-B-Locus identisch	2
IV	2 Ag. identisch, wovon eines auf dem HLA-B-Locus	2
V	andere Konstellationen	2,3,4

In den Fällen, in denen keine Spender mit identischem HLA-Phänotyp gefunden werden konnten, wurden Spender mit der nächstbesten realisierbaren Übereinstimmung gesucht. Da ABO-Inkompatibilität HLA-kompatibler Zellseparatorkonzentrate den Transfusionseffekt nicht beeinflußt

(LOHRMANN et.al.56), wurden für Empfänger der Blutgruppen A, B und AB auch Spender der Blutgruppe 0 ausgewählt, sofern eine HLA-Kompatibilität anders nicht zu erreichen gewesen wäre. Bei Rhesus-positiven Empfängern wurden sowohl Rhesus-positive als auch Rhesus-negative Spender ausgewählt.

Bei Spendern der Klassifikation IV wurden diejenigen bevorzugt, deren mit dem Empfänger identisches HLA-B-Locus-Antigen einer kreuzreagierenden Gruppe angehörte.

Auf diese Weise wurde eine Rangliste der fünf bestmöglichen Spender erstellt. War ein gewünschter Spender verhindert, rückte der nächstbeste nach.

2.1.4 Zellseparation

Die Zellseparatorkonzentrate wurden durch den nach dem Prinzip der Intermittierend Fließenden Leukapherese arbeitenden Zellseparator "Haemonetics Model 30 Blood Processor" (Haemonetics Corp., Braintree, USA) von den Mitarbeitern der Blutbank Düsseldorf gewonnen.

Vor der Spende wurden die Spender über die Zellseparation informiert und um ihr Einverständnis gebeten. In keinem Fall erfolgte eine Konditionierung der Spender, i.e. eine medikamentöse Vorbehandlung oder spezielle Zusätze während der Spende zur Steigerung der Zellausbeute. Bei der Spende selbst wurde wie folgt vorgegangen: Nach Venenpunktion wurde das Spenderblut mittels einer Pumpe in eine speziell gestaltete Zentrifugenglocke geleitet, in der sich die Blutkomponenten entsprechend ihrer Sedimenationseigenschaften anreichern. Nach Füllung der Glocke wurde der Blutzufluß verlangsamt und die Schicht der Thrombozyten und Leukozyten in einen Auffangbeutel geleitet. Erythrozyten und Plasma wurden in einem zweiten Beutel gesammelt. Dieser Sammelzyklus wurde gegebenenfalls ein zweites Mal wiederholt. Nach Gewinnung der Thrombozytenkonzentrate wurden Erythrozyten und Plasma dem Spender retransfundiert.

Während der Prozedur wurde der Spender hinsichtlich möglicherweise auftretender Nebenwirkungen wie z.B. Angst, Übelkeit, Schwindel und andere vegetative Reaktionen überwacht.

Der Spendevorgang einschließlich Retransfusion dauerte bei einem Sammelzyklus ca. 25 Minuten, bei zwei Zyklen ca. 45 Minuten.

Die Thrombozyten wurden anschließend zur Vermeidung einer graft-versus-host-Reaktion mit 2.000 rad bestrahlt. Sie wurden bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von sechs Stunden nach Herstellung den Empfängern transfundiert.

2.2 Eigene Untersuchungen

2.2.1 Konzentratuntersuchungen

2.2.1.1 Thrombozyten- und Leukozytenzählung

Unmittelbar nach Abschluß der Zellseparation wird das Konzentratvolumen mittels einer Waage mit ml-Skala, die zuvor auf das Gewicht eines leeren Konzentratbeutels geeicht worden ist, gemessen. Nach Durchmischung des Konzentratbeutels werden mit einer Plastikspritze 2ml Konzentrat entnommen und in ein EDTA-Kunststoffröhrchen gefüllt. Nach dreiminütiger Äquilibration werden die Proben bei Raumtemperatur (RT) isoton verdünnt.

Die Zählung der Leukozyten und Thrombozyten erfolgt mittels eines Coulter Counters Modell S Plus (Coulter Electronics, Hialeah, USA).

Die Ausbeute an Leukozyten und Thrombozyten je Zellseparatorkonzentrat wird errechnet, indem Leukozyten- und Thrombozyten-Konzentrationen pro ml mit dem gemessenen Konzentratvolumen multipliziert werden.

2.2.1.2 Differentialblutbild

Von dem Zellseparatorkonzentrat wird manuell ein Blutausstrich angefertigt und luftgetrocknet. Er wird mit "Sangodiff"-Färbefolien (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt, was dem klassischen Färbebild nach PAPPENHEIM entspricht. Nach der SCHILLINGSCHEN Methode werden im Blutausstrich mit Ölimmersion 200 Leukozyten differenziert. Der prozentuale Anteil der Granulozyten wird dokumentiert.

2.2.2 HLA-Antikörpersuche

Der Nachweis von HLA-Antikörpern im Probandenserum erfolgt im Mikrolymphozytotoxizitätstest nach der N-I-H-Methode (TERASAKI et.al.85).

HLA-Testlymphozyten

Die Probandenseren werden mit 100 Testlymphozytenpopulationen bekannter Antigenstruktur getestet, wobei jede Spezifität vertreten ist. Bei den Testlymphozyten handelt es sich um Zellen, die vom Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin im Rahmen der Spenderauswahl gewonnen und deren HLA-Antigenstruktur dort ermittelt wurde.

Die Testlymphozyten sind in 40%iger HANKS'scher Lösung (Hanks-Solution Nr. 811070, Fa. Biotest, Frankfurt) auf 2.000 Zellen/ml eingestellt.

Serumpräparation

Zur Antikörpersuche werden 10ml venöses Nativblut ohne Zusätze verwendet. Nach vollständiger Spontangerinnung wird das Serum durch einmaliges Zentrifugieren mit 550 g über 10 Minuten gewonnen.

Wenn der Test nach Serumgewinnung nicht sofort durchführbar war, z.B. an Wochenenden, wurde das Serum bei -20°C eingefroren. Bei derartiger Lagerung sind die Seren über Monate haltbar.

Lymphozytotoxozitätstest

Jede der 60 Vertiefungen einer Mikrotestplatte (TERESAKI-TRAY, Fa. Greiner) wird unter 5 ul Öl (Paraffin dickflüssig, Nr. 7160, Fa. Merck) mit je 1 ul Probrandenserum und je 1 ul einer der Testlymphozytenpopulationen beschickt. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumthemperatur (RT) werden in jede Vertiefung 5 ul Kaninchen-Komplement (Fa. Behring) zugegeben und für 60 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend werden in jede Vertiefung 5 ul einer 5%igen Eosin-Lösung, die zuvor gefiltert worden ist um evtl. ausgefallene Kristalle zu entfernen, zugegeben und für 2 Minuten bei RT inkubiert.

Sofern es durch im Probandenserum vorhandene Antikörper gegen die HLA-Merkmale der Testlymphozyten zu einer zytotoxischen Reaktion ge-

kommen ist, färben sich die lysierten Zellen innerhalb von 3 Minuten rot an. Zur Fixierung werden jeder Vertiefung 5 ul einer 35%igen Formalin-Lösung (Nr. 4003, Fa. Merck), die mit einer 0,1 N Natronlauge (Nr. 7160, Fa. Merck) auf den physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt worden ist, zugesetzt. Die Ablesung erfolgt nach 60 Minuten, die zur Sedimentation der Zellen abgewartet werden, im umgekehrten Phasenkontrastmikroskop (Invertoskop D., Fa. Zeiss).

Sofern bei Abwesenheit zytotoxischer HLA-Antikörper im Probandenserum keine lysierten, d.h. rot gefärbten Zellen vorhanden sind, wird der Test als negativ bewertet. Ist es demgegenüber durch Antigen-Antikörper-Reaktionen zu einer Lyse der Zellen gekommen, wird der Test als positiv bewertet. Der prozentuale Anteil der positiven Reaktionen auf Testlymphozyten an der Gesamtzahl der 60 verwendeten Testlymphozytenpopulationen wird dokumentiert.

Neben den Testlymphozyten werden zum Ausschluß von Verfahrensfehlern industriell hergestellte Kontrollseren (Fa. Behring) mitgeführt.

2.2.3 Lymphozytendifferenzierung

Zur Ermittlung des relativen Anteils von B-Lymphozyten an der Gesamt-Lymphozytenpopulation werden nach einer von VAN ROOD et.al. (92) entwickelten Methode die B-Lymphozyten mit flourescein-konjugiertem Anti-Immun-Globulin isoliert angefärbt.

Lymphozytenpräparation
Unter der Vorlage von 50 ul Heparin (Liquemin, 25.000 I.E., Fa. Hoffmann-La Roche) in einer 5 ml Plastikspritze werden jeweils 5 ml Venenblut entnommen.

2 ml Blut werden mit 4 ml Phophat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS-Dulbenco, Fa. Seromed) gemischt und die 6 ml verdünntes Blut vorsichtig auf einen Dichtegradienten (Lymphoprep, Fa. Holter) überschichtet, ohne daß die beiden Lösungen sich dabei vermischen. Dieser Ansatz wird doppelt ausgeführt und die beiden so vorbereiteten Lösungen für 15 Minuten bei 550 g zentrifugiert.

Die Lymphozyten- und Thrombozytenschichten, die sich danach scheibenförmig über der Gradientenlösung anreichern, werden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abpipettiert.

100 ml PBS werden mit 5 ml 20%igen Rinder-Serum-Albumin (BSA) gemischt, um eine 1%ige Lösung von PBS-BSA herzustellen. Die gewonnene Zellsuspension wird dreimal in 1%iger PBS-BSA-Lösung für 10 Minuten bei 200 g zentrifugiert, um die in der Lösung noch vorhandenen Thrombozyten zu entfernen. Nach der ersten und zweiten Zentrifugation werden die Lymphozyten durch Zählen in einer Neubauer-Zählkammer bei gleichzeitiger Prüfung der Vitalität auf $12 \cdot 10^6$ Zellen pro ml mit PBS-BSA 1%ig eingestellt.

Markierung der B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten werden durch Anti-Human-Immun-Globulin G, das mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert ist, gekennzeichnet. FITC ist ein Fluorochrom, das den Gipfel seines Emmissionsspektrums im Grünbereich hat und sich zum Studium antigener Determinanten an der Oberfläche von Zellen eignet.

1 ml Anti-Human-IgG, das mit FITC markiert ist (Anti-Human-IgG OTIX 0405, Fa. Behring), wird in 2 ml Aqua dest. gelöst, um eine 1:3-Lösung herzustellen. Der Zellsuspension werden 100 ul FITC-konjugiertes Anti-IgG je 1 ml Suspension zugegeben und bei 37°C über 10 Minuten inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension dreimal in 1%igem PBS-BSA für 10 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Nach der ersten und zweiten Zentrifugation werden die Lymphozyten durch Zählen in der Neubauer-Zählkammer bei gleichzeitiger Überprüfung der Vitalität auf 12 10^6 Zellen pro ml eingestellt. Nach der dritten Zentrifugation werden die Lymphozyten in Mc Coy's 5 a Medium suspendiert und auf $12 \cdot 10^6$ Zellen je ml eingestellt.

Die sofortige Ablesung erfolgt mit einem Zeiss-Mikroskop Standard mit Fluoreszenz-Auflicht-Kondensor IV FI unter Zuhilfenahme einer Zählschablone. Die B-Lymphozyten, die mit dem FITC-markierten Anti-Human-IgG einen Antigen-Antikörper-Komplex gebildet haben, leuchten im Fluoreszens-Mikroskop grün auf, während die nicht markierten T-Lymphozyten nicht fluoreszieren.

Zunächst wird bei Auflicht-Fluoreszenz mit der Filterkombination 487709 die Anzahl der markierten B-Lymphozyten gezählt. Dann wird bei geöffneter Leuchtfeldblende des Phasenkontrastmikroskopes die Gesamtzahl der vorhandenen Lymphozyten ermittelt. Auf diese Weise werden B-Lymphozytenzahl und Gesamtlymphozytenzahl für zehn Zählfelder ermittelt und der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl errechnet.

2.2.4 Sonstige Spenderdaten

Aus den Spenderprotokollen der Blutbank werden für jede Zellseparation Datum und Name des Spenders erfaßt. Nach Ablauf des Untersuchungszeitraumes von 18 Monaten werden die Gesamtzahl der Zellseparationen und die Gesamtzahl der dazu herangezogenen Spender ermittelt. Ferner werden die Anzahl der Thrombopheresen, denen sich der einzelne Spender im Untersuchungszeitraum unterzogen hat, und die Spendenserien, d.h. die Zahl jeweils täglich aufeinanderfolgender Zellseparationen je Spender, festgestellt.

Für alle der Zellseparation unterzogenen Spender werden aus den Unterlagen der Blutbank die Ergebnisse der anläßlich jeder Spende durchgeführten Bestimmungen von Hämoglobin, Leukozyten- und Thombozytenzahl, HBsAg sowie Lues-Serologie erfaßt und hinsichtlich etwaiger Abweichungen von den oben beschriebenen Normalwerten untersucht.

2.2.5 Spender-Empfänger-Konstellationen

Um das Ausmaß der Übereinstimmung von Spendern und Empfängern im HLA-System bei den im Untersuchungszeitraum an der Universität Düsseldorf durchgeführten Transfusionen von Thrombozytenkonzentraten quantifizieren zu können, werden die jeweiligen Konstellationen von Spender und Empfänger im HLA-System ermittelt.

Dazu werden den Transfusionsprotokollen Konzentratnummer und Empfänger entnommen. Aufgrund der Konzentratnummer wird der Spender identifiziert. Die HLA-Phänotypen des Spenders und Empfängers werden den Typisierungsprotokollen des HLA-Labors entnommen. Es wird ein Verzeichnis angefertigt, das für jeden Empfänger Name, Geburtsdatum, Diagnose, Blutgruppe und HLA-Phänotyp umfaßt.

Für die einzelnen Empfänger wird jede Thrombozytentransfusion mit Datum, Konzentratnummer, Name und HLA-Phänotyp des Spenders vermerkt.

Die Spender-Empfänger-Konstellationen im HLA-System werden durch Vergleich der HLA-A- und -B-Antigene von Spender und Empfänger ermittelt. Anzahl und Spezifität voneinander abweichender Antigene (Mismatches) werden für jede Transfusionskonstellation und durch Summation für jeden Empfänger insgesamt festgestellt.

Sofern die HLA-Antikörperbestimmung Hinweise auf die Bildung zytotoxischer Antikörper nach der Thrombozytentransfusion ergeben hat, wird aufgrund der Krankenakte des Empfängers eine Transfusionsanamnese erstellt.

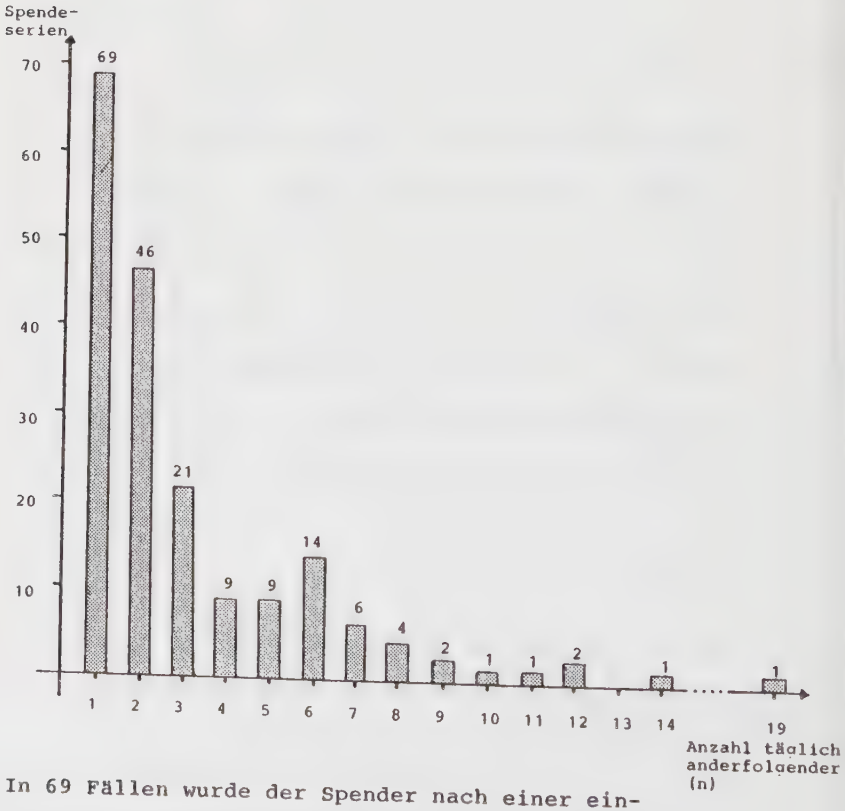
3. Ergebnisse

In der Zeit vom 01.01.1980 bis 30.06.1981 wurden von den Mitarbeitern des Instituts für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf (Direktor: Prof.Dr.H.TH. Brüster) durch Intermittierend Fließende Zellseparation 560 Thrombozytenkonzentrate von 106 Einzelspendern gewonnen. Diese Konzentrate wurden 72 Patienten der Universitätskliniken Düsseldorf transfundiert. Jeder Patient erhielt im Durchschnitt 7,6 Thrombozytenkonzentrate, wobei im Minimum einmalig (11 Patienten), im Höchstfall 42 Konzentrate (ein Patient) transfundiert wurden.

3.1 Spenderuntersuchungen

Insgesamt wurden 106 Einzelspender für 560 Zellseparationen ausgewählt. Unter Einbeziehung des gesamten Untersuchungszeitraumes unterzog sich jeder Spender durchschnittlich fünf Zellseparationen, wobei ein Höchstwert von 34 Spenden in 18 Monaten erreicht wurde, während 32 Spender einmalig spendeten.

Zur Verdeutlichung der individuellen Spenderbelastung wurde die jeweilige Anzahl täglich aufeinderfolgender Zellseparationen eines Spenders erfaßt. Es ergaben sich 186 verschiedene Separationsserien (Tab.7).



In 69 Fällen wurde der Spender nach einer einmaligen Thrombopherese von einem anderen Spender abgelöst bzw. war eine zweite Transfusion nicht mehr erforderlich. 46mal wurde eine Zellseparation von einem Spender an zwei, 21mal an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

Die restlichen 50 Spendeserien (26,9 %) entfallen auf vier und mehr täglich aufeinanderfolgende Zellseparationen. Die längste Spendeserie lag bei 19 Zellseparationen in 21 Tagen. Aus Tab.7 geht hervor, daß in 32 Fällen Spender 6 bis 19 Tage ohne Unterbrechung täglich einer Zellseparation unterzogen wurden.

Während der 560 Thrombopheresen durch den Haemonetics Model 30 Zellseparator waren keine Nebenwirkungen zu verzeichnen. Lediglich in einem Fall gab der Spender an, er verspüre eine leichte Übelkeit, die mit Retransfusion des prozessierten Blutes endete. Die restlichen 559 Spender gaben an, sich subjektiv wohlzufühlen.

Die anläßlich jeder Spende kontrollierten Laborparameter lagen sämtlich im Normbereich. Die serologischen Untersuchungen auf Hepatits B und Lues blieben negativ. Bei den Blutbildkontrollen war in keinem Fall ein Absinken des Hämoglobins unter 13.0 g/dl, der Thrombozytenzahlen unter 150.000/mm³ und der Leukozyten unter 4.000/mm³ zu verzeichnen.

Bei zwölf Spendern wurde zusätzlich der relative Anteil der B-Lymphozyten-Subpopulation an der Gesamtlymphozytenzahl bestimmt.

Die 12 untersuchten Spender waren im Schnitt 14.1 Zellseparationen unterzogen worden, was der doppelten Leistung des Durchschnittsspenders entsprach. Das Kollektiv umfaßte sowohl den Spender mit der Höchstzahl von 34 Separationen, als auch je einen Spender nach ein und vier Thrombopheresen. In Tab.8 sind die Untersuchungsergebnisse im einzelnen aufgeführt.

Tab. 8
Prozentualer Anteil der B-Lymphozyten

Spender	Anzahl Pheresen	B-Lymphozyten-Anteil (%)
W.,D.	1	11,7
S.,J.	4	10.5
F.,W.	9	9.4
H.,K.	11	13.7
A.,D.	11	10.0
B.,W.	11	11,2
E.,W.	11	11.4
I.,W.	14	12.2
H.,F.	19	14.6
C.,U.	21	10.0
G.,H.	26	11.8
S.,G.	34	15.1
12	14	11.8

Im Schnitt wurde ein B-Lymphozytenanteil von 11.8 +/- 1.8 (1SD) ermittelt.

Die Ergebnisse lagen innerhalb des von KOEPKE et.al. (46) angegebenen physiologischen Normalwertes von 10 - 14 % der Gesamtlymphozytenzahl. Es ergaben sich keine Abweichungen des relativen Anteils von B-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl von der Norm.

3.2 Konzentratuntersuchungen

Unmittelbar nach der Gewinnung der Zellseparatorkonzentrate wurden 100 Konserven im Hinblick auf die Konzentration von Thrombozyten und Leukozyten untersucht. Die Ergebnisse im einzelnen zeigt die folgende Tab.9.

Nº	Thrombo	Leuko	Nº	Thrombo	Leuko	Nº	Thrombo	Leuko	Granulo	Nº	Thrombo	Leuko	Granulo
1566	2290	26.2	2523	1150	16.1	1795	1320	13.1	0.39	4995	938	9.2	1.56
1591	3250	17.0	2670	1400	14.6	2843	2670	20.0	1.00	5003	1186	11.7	0.70
1599	2390	29.5	2875	1990	12.4	2800	1760	16.4	2.30	5027	1380	12.5	0.62
1600	2160	11.4	2920	2o10	21.4	2911	1050	9.5	1.62	5044	1300	14.3	1.00
1601	1860	11.0	2923	1360	13.6	4733	916	11.8	3.54	5051	898	20.1	1.40
1629	2980	10.2	2932	1040	12.9	4737	1180	18.7	4.67	5055	1418	17.9	0.89
1647	1660	15.7	2933	938	16.6	4722	1260	11.0	2.20	5060	1312	14.7	0.44
1680	4140	14.0	2939	667	10.2	4757	1360	18.8	3.94	5061	1194	19.1	0.19
1702	2220	18.3	2941	1480	25.1	4766	1190	15.0	1.05	5062	1272	18.5	1.85
1705	2170	33.4	2952	900	12.8	4784	1480	15.0	3.45	0001	818	9.8	2.16
1724	2290	13.4	2953	1650	23.0	4819	1400	11.4	3.42	0139	876	17.6	4.05
1762	1440	12.9	2968	998	20.2	4844	793	11.8	2.48	0147	1395	18.8	1.50
1820	1690	18.8	2969	735	12.2	4865	891	16.7	3.84	0157	1067	12.3	0.86
1838	1250	16.6	2981	1110	11.1	4898	770	14.5	2.32	0164	1253	17.4	1.39
2036	1800	19.9	2982	864	16.3	4921	993	14.3	0.86	0175	939	14.1	0.84
2069	1280	11.7	3006	1460	9.7	4922	917	9.0	0.36	0192	846	14.1	1.55
2093	745	16.9	3007	872	18.3	4923	994	18.3	1.28	0221	997	19.3	0.04
2120	1650	21.3	3011	740	15.7	4924	824	10.3	0.21	0235	978	13.2	2.11
2169	2200	22.0	3027	1160	15.3	4925	764	8.6	1.21	0296	1412	13.6	0.54
2194	2530	24.2	4509	988	10.8	4951	894	10.0	0.30	0328	1252	14.4	0.72
2214	1350	10.8	4514	837	10.6	4952	793	10.5	0.10	0345	1400	13.3	0.53
2240	2200	21.6	4520	1027	10.0	4959	934	11.8	0.71	0360	1035	18.9	0.76
2266	1280	16.8	4581	903	14.3	4975	758	11.1	0.55	0361	845	22.1	2.43
2314	1580	15.4	4753	1130	11.5	4976	798	10.5	0.42	0362	1004	16.3	0.49
2517	1630	14.5	4555	962	13.0	4977	1170	16.3	2.44	0368	1224	22.2	1.11

Die durchschnittliche Thrombozytenkonzentration je ml Zellseparatorkonzentrat betrug $1.3 \cdot 10^9$ (St.Abw.:$0.6 \cdot 10^9$; x_{min}:$0.7 \cdot 10^9$; x_{max}:$3.2 \cdot 10^9$; R:2.5).
Der mittlere Leukozytengehalt je ml Konzentrat betrug 15.4 10^6 (St.Abw.:$4.6 \cdot 10^6$; x_{min}:$8.6 \cdot 10^6$; x_{max}:33.4 $10.^6$; R:24.8).

Bei den 100 untersuchten Konzentraten wurde im Schnitt ein Volumen von 100 ml erreicht.
Auf der Grundlage dieses durchschnittlichen Konzentratvolumens ergab sich eine Gesamtausbeute von $1.4 \cdot 10^{11}$ Thrombozyten je Konzentrat (St.Abw.:$0.8 \cdot 10^{11}$; x_{min}:$0.4 \cdot 10^{11}$; x_{max}:$5.1 \cdot 10^{11}$; R:4.7).
Die Gesamtleukozytenausbeute betrug $1.5 \cdot 10^9$ Leukozyten je Konzentrat (St.Abw.:$0.6 \cdot 10^9$; x_{min}:$0.7 \cdot 10^9$; x_{max}:$4.2 \cdot 10^9$; R:3.5).

Bei 60 der 100 untersuchten Konzentrate war die Zellseparation nach einem Sammelzyklus beendet worden. Das durchschnittliche Volumen betrug in diesen Fällen 85 ml, woraus sich eine Gesamtausbeute von $0.9 \cdot 10^{11}$ Thrombozyten (St.Abw.: $0,3 \cdot 10^{11}$) ergab.

In 40 Fällen war die Thrombopherese mit zwei Sammelzyklen erfolgt, wobei im Mittel ein Volumen von 125 ml erreicht wurde. Diese Konzentrate enthielten im Schnitt $2.1 \cdot 10^{11}$ Thrombozyten (St.Abw.: $0,9 \cdot 10^{11}$).

Im Vergleich der Gesamtausbeuten bei einem und zwei Sammelzyklen je Separation ergibt sich eine Verdopplung der Thrombozytenausbeute durch einen zweiten Zyklus (Faktor 2.3).

Für 50 Konzentrate wurde zusätzlich ein Differential-Blutbild angefertigt; daraus ergab sich eine mittlere Granulozytenkonzentration von $1.5 \cdot 10^{6}$ je ml Konzentrat (St.Abw.: $1,1 \cdot 10^{6}$), was einer durchschnittlichen Gesamtausbeute von $1.6 \cdot 10^{8}$ Granulozyten je Thrombozytenkonzentrat (St.Abw.: $1,3 \cdot 10^{8}$) ergibt.
Tab.10 faßt die Konzentratuntersuchungen zusammen.

Tab. 10
Konzentratausbeute (Haemonetics Model 30)

	1 Zyklus n=60	2 Zyklen n=40	Mittelwert n=100
Leukozyten	$1.2 \cdot 10^{9}$	$2.4 \cdot 10^{9}$	$1.5 \cdot 10^{9}$
Granulozyten	$1.3 \cdot 10^{8}$	$2.4 \cdot 10^{8}$	$1.5 \cdot 10^{8}$
Thrombozyten	$0.9 \cdot 10^{11}$	$2.1 \cdot 10^{11}$	$1.4 \cdot 10^{11}$

3.3 Spender-Empfänger-Konstellationen im HLA-System

Hinsichtlich der Konstellation von Spendern und Empfängern im HLA-Phänotyp wurden alle 560 Thrombozytentransfusionen, die im Untersuchungszeitraum durchgeführt wurden, erfaßt. Bei den 560 Transfusionen ergaben sich 186 verschiedene Spender-Empfänger-Konstellationen. Durch Vergleich des HLA-Phänotyps des Spenders mit demjenigen des Empfängers wurde die Anzahl voneinander abweichender HLA-Antigene für den A- und B-Locus (mismatch) bestimmt.

Die folgende Tabelle verzeichnet zusammenfassend die erreichten Konstellationen für alle 72 Patienten. Die Transfusionskonstellationen sind entsprechend der Anzahl der Mismatches für den HLA-A- und -B-Locus unterteilt. In der Tabelle sind die für einen Patienten erreichten Konstellationen jeweils summiert.

Tab. 11

Nº	Patient	HLA-Phänotyp	Antikörper prae transf.	Transfusions-Konstellation 0-0	1-0	2-0	0-1	1-1	2-1	0-2	1-2	2-2	Antikörper post trans
1	A.,S.	W24,W30/31, 15, W35	neg.	26	14	1						1	neg.
2	A.,A.	2, W24, W21, 40	neg.	6	1			3					neg.
3	A.,W.	1,11,15.1, 27				3							
4	B.,S.	3, 30/31, 5, 7			1								
5	B.,S.	1, 2, 8, 17	neg.	1			3						
6	B.,S.	2, W24, 7	neg.				3						neg.
7	B.,H.	W32, W24, 7				2		3					
8	B.,M.	11, W24, 5, W44	neg.			8		3	3				2%
9	C.,O.	1, 2, 5, 40	neg.	1									neg.
10	D.,E.	2, 28, 5, 18			6			1					
11	D.,W.	1, 26, 8, W38	72%	2									72%
12	D.,E.	9, 11, 7, W35	neg.		1								
13	D.,A.	1, W24, 13, 27			1	2		2	2				
14	E.,C.	3, 11, 7, 17.1	neg.		8								neg.
15	F.,F.	2, 30/31, 5, 40	neg.	2									
16	F.,H.	2, 10, W44, W22.1	neg.			1		7					neg.
17	F.,M.	11,W44, 18	neg.		1	11							neg.
18	F.,M.	2, 26, 15.1, W49	2%		6								2%
19	G.,N.	W24, 29, 17, W39	neg.			13							neg.
20	G.,H.	11, W24, W22, W44	54%			1							
21	G.,M.	1, 2, 8, 40.2	neg.	2	1		3	2					
22	G.,J.	2, W31, 7, W39	neg.			5							
23	G.,J.	2, 26, 17, W22	neg.			1	2	5					84%
24	H.,J.	1, W30, W41, W35	neg.,			4							
25	H.,J.	1, 2, 5, 7	neg.		6								neg.
26	H.,V.	1, 9, W44, 8		1	1						2		
27	H.,P.	2, 17	neg.	19									neg.
28	H.,H.	2, 30, 13, 15.1		1									
29	H.,S.	2, 25, 18, W41						1					
30	J.,S.	1, 2, 7, W22	neg.			1	13	12					96%
31	J.,A.	2, 3, W44, W35	neg.	1									
32	K.,N.	3, 24, 8 , W41			1			9	5				
33	K.,T.	1, 11, W35, 37	neg.		14				2				neg.
34	K.,C.	1, 3, 27, W35	neg.			1							neg.
35	K.,J.	2, 3, W35, 14	neg.			5							neg.
36	K.,H.	11, W30/31, W35	neg.	3					7				
37	K.,J.	2, 3, 7, W44	neg.	2									
38	K.,S.	1, 2, 8	neg.	7									
39	K.,R.	1, W32, 5, 8		2									
40	L.,S.	2, 29, 7, W44	neg.		2			2					
41	L.,A.	1, 2, 8, W57	6%	11	5								10%
42	L.,B.	1, 9, 8, 18		2									
43	L.,D.	3, 10, 15.1, W35	neg.						8				neg.
44	M.,R.	2, W24, 27, 15.2	neg.		1			6					
45	M.,R.	2, W44, W35	neg.		1	2		14					neg.
46	M.,S.	2, 29, 5, 14						1					
47	M.,L.	1, W32, 8, W35		1									
48	M.,H.	2, W24, W44, 8			3		1						
49	M.,M.	2, W24, 27, 18						11					
50	N.,J.	W23, 28, 27, W35	neg.					19					
51	N.,R.	2, 3, 13, 27	neg.		2		2	4					100%
52	O.,J.	3, 29, 5, 12	neg.			4							neg.
53	O.,W.	2, W44, W60	neg.		1								
54	R.,T.	1, 8, W44	neg.	4	5	1							neg.
55	S.,R.	2, W39, 5	neg.		9								neg.
56	S.,J.	2, 3, 7, 17	neg.	6	17		1						6%
57	S.,R.	1, 2, 7, W39	neg.		9								neg.
58	S.,K.	2, W30, 5, 7	neg.	6	3	8							neg.
59	S.,M.	W24, W44	neg.	1	4								
60	S.,W.	3, W53							4				
61	S.,L.	1, 11, 8, 18	neg.	8									
62	S.,A.	2, 3, 5, 7	neg.	6	14								neg.
63	S.,M.	1, W32, W44, 17	neg.	8									neg.
64	S.,M.	10, 28, 7, 8	neg.		1	2							
65	T.,G.	2, 3, 7, 15.1	neg.	3									neg.
66	T.,M.	2, W24, 27, 15.1	neg.		5	8							neg.
67	U.,U.	9, 11, W35, 5			2	3		1					
68	W.,L.	3, W24, 7, 13	4%		6								4%
69	W.,L.	29, 40.2	neg.		5			1					neg.
70	W.,W.	28, 11, 7, W44	neg.		7								
71	W.,F.	3, W23, 5, 14	neg.					8					neg.
72	Y.,A.	2, 26, 40, W38	80%					5			1		65%

Daneben gibt diese Tabelle einen Überblick über die Ergebnisse der HLA-Antikörpersuchtests vor und nach Transfusion, auf die jedoch erst in einem späteren Zusammenhang eingegangen wird (s.S. 61).

Bei 132 von 560 Spenden (23,6 %) waren Spender und Empfänger in allen vier HLA-A- und -B-Antigenen identisch; es bestand 'Full-house'-Identität.

In 186 Fällen (33,2 %) wiesen Spender und Empfänger ein voneinander verschiedenes HLA-Antigen auf, während die drei übrigen HLA-A- und -B-Merkmale identisch waren. Dabei unterschied sich das untersuchte Paar in 164 Fällen (29,3 %) in einem HLA-A-Antigen, in den übrigen 22 Fällen (3,9 %) in einem B-Locus-Merkmal.

Bei 207 der 560 Spenden (36,9 %) differierten Spender und Empfänger in zwei Antigenen, während sie die zwei anderen Antigene teilten. In 87 dieser Fällen lagen beide Mismatches auf dem A-Locus, sodaß das untersuchte Paar B-Locus-identisch war (15,5 %). Bei 120 Spenden lag je ein differierendes Antigen auf dem A-Locus und B-Locus (21,4 %). In keinem Fall dieser Gruppe waren beide Mismatches auf dem B-Locus angesiedelt.

34 der 560 Spenden (6 %) zeigten 3 unterschiedliche HLA-Antigene bei Spender und Empfänger. In 31 Fällen, entsprechend 5,5 % der Gesamtzahl, lag das gemeinsame Antigen auf B-Locus. In 3 Fällen (0,5 %) wies der A-Locus das gemeinsame Antigen auf.

In einem Fall (0,2 %) zeigten Spender und Empfänger keine Übereinstimmung der HLA-Antigene.

Tab.12 zeigt zusammenfassend die Spender-Empfänger-Konstellationen bezüglich der Anzahl unterschiedlicher HLA-Antigene.

Tab. 12
Anzahl abweichender HLA-Antigene (Mismatches) von Spendern und Empfängern bei Thrombozytentransfusionen

Anzahl der Mismatches	Thrombozytentransfusionen	
	n	%
0	132	23.6
1	186	33.2
2	207	37.0
3	34	6.1
4	1	0.2

Diese Daten wurden im nächsten Schritt der Auswertung mit Blick auf die Lokalisation der Mismatches auf den Genloci differenziert.

Kein Mismatch und somit HLA-Identität von Spender und Empfänger wurde in 132 der 560 Fälle (23,6 %) erreicht.

Eine B-Locus-Identität wurde in 251 Fällen (44,8 %) verzeichnet.

Davon lag in 164 Paaren (29,3 %) ein Mismatch auf dem A-Locus vor, während 87 Transfusionen (15,6 %) zwei Mismatches des A-Locus zeigten.

Die restlichen 177 Paarungen wiesen Mismatches der B-Locus-Antigene auf. In 173 Fällen (30,9 %) unterschieden sich Spender und Empfänger in einem B-Locus-Antigen. Darunter zeigten 22 Fälle kein zusätzliches Mismatch des A-Locus, 120 Fälle ein A-Locus-Mismatch und 31 Fälle in beiden HLA-A-Antigenen Unterschiede.

Zwei abweichende B-Locus-Antigene waren in vier Paarungen (0,7 %) zu verzeichnen.

Tab. 13
Anzahl abweichender HLA-Antigene (Mismatches), differenziert zwischen HLA-A-Locus und HLA-B-Locus

	Mismatch(es)		Transfusionen		
	HLA-A	HLA-B	n=560	%	
"Full-house"-Identität	0	0	132	23.6	
HLA-B-Locus identisch	1	0	164	29.3	
	2	0	87	15.5	44.8
kreuzreagierende	0	1	22	3.9	
Antigene	1	1	120	21.4	
	2	1	31	5.5	
	0	2	0	0.0	
	1	2	3	0.5	
	2	2	1	0.2	

Fallbeschreibungen

An den dargestellten Spender-Empfänger-Konstellationen waren u.a. auch 14 Spender beteiligt, die phänotypisch nur zwei nachweisbare HLA-Antigene aufwiesen, sodaß Verdacht auf Homozygotie bestand. Die Verwendung dieser Spender ermöglichte für

Empfänger mit seltenen HLA-Phänotypen die Vermeidung von Mismatch-Konstellationen bei der Transfusion. Tab.14 demonstriert beispielhaft derartige Spender-Empfänger-Paarungen.

Tab. 14 Fallbeschreibungen
Beispiele von Transfusionskonstellationen
mit homozygoten Spendern

		HLA-Phänotyp A	A	B	B
Pat.	D.W.	1	10(26)	8	W16(W38)
Sp.	A.D.	1		8	
Pat.	H.P.	1	2	8	17.1
Sp.	H.K.	1		8	
Sp.	W.G.		2		17
Pat.	L.A.	2		17	
Sp.	H.F.	2		17	
Pat.	S.M.	1	W32	17	12(W44)
Sp.	B.P.	2			12(W44)
Sp.	W.G.	2		17	

Insbesondere bei Empfängern, die eine größere Zahl von Thrombozytentransfusionen benötigten,

wurde der Entschluß zum Wechsel des Spenders auch von der Güte der Spender-Empfänger-Konstellation abhängig gemacht. Bei ungünstigen Konstellationen wurde der Spender baldmöglichst durch einen besser angeglichenen Spender ersetzt, während ein Spender bei günstigen Paarungen unter sorgfältiger Überwachung der Laborparameter und des subjektiven Wohlbefindens für mehrere Transfusionen beibehalten wurde. Bei dem beispielhaft in Tab. 15 vorgestellten Patienten wurden für 38 Transfusionen in vier Serien 24 HLA-identische Konstellationen, 15-B-Locus-identische Paarungen und vier kreuzreagierenden Beziehungen erreicht.

Tab. 15 Fallbeschreibung

Beispiel eines multitransfundierten Patienten mit günstigen Spender-Empfänger-Konstellationen

	HLA-Phänotyp		Mismatch HLA-A	Mismatch HLA-B	Spenden n	Antikörper
Patient	W24,W30/31;	15,W35				neg.
Spender						
S.G.	1,2	4,5	2	2	1	
B.R.	W24	W35	0	0	3	
I.R.	W24	15,W35	0	0	3	neg.
I.W.	W24,3	W35	1	0	8	
I.R.	W24	15,W35	0	0	6	neg.
I.W.	W24,3	W35	1	0	5	neg.
I.W.	W24,3	W35	1	0	1	
F.W.	2,W32	15,W35	2	0	1	neg.
B.R.	W24	W35	0	0	2	neg.
I.R.	W24	15,W35	0	0	12	neg.

3.4 HLA-Antikörpersuche

3.4.1 HLA-Antikörper vor Thrombozytentransfusion

Zur Ermittlung einer bereits vor der Transfusion von Thrombozytenkonzentraten bestehenden Sensibilisierung gegen HLA-Antigene beim Empfänger wurde bei 55 Patienten ein HLA-Antikörpersuchtest prae transfusionem durchgeführt. Die einzelnen Untersuchungsergebnisse sind in Tab. 11 auf S. 54 in Verbindung mit den Transfusionskonstellationen bereits verzeichnet.

Bei 49 Patienten (89,1 %) verlief der Test auf HLA-Antikörper negativ. In sechs Fällen (10,9 %) konnten im Empfängerserum zirkulierende HLA-Antikörper nachgewiesen werden, wobei der Antikörper durchschnittlich mit 36,3 % der angebotenen Zellen reagierte.

Demnach bestand in 10,9 % der Fälle bereits vor der ersten Transfusion von Zellseparatorkonzentraten eine Sensibilisierung gegen HLA-Antigene

mit Bildung zytotoxischer Antikörper (Tab. 16).

Tab. 16
HLA-Antikörper vor Thrombozytentransfusion

Antikörpertest	n	%
negativ	49	89.1
positiv 2% 4% 6% 54% 72% 80%	6	10.9
gesamt	55	100.0

3.4.2 HLA-Antikörper nach Thrombozytentransfusion

36 Empfänger von Zellseparatorkonzentraten konnten vor und nach Transfusion auf HLA-Antikörper untersucht werden. Bei den restlichen Patienten erfolgte keine Neueinsendung von Serum. Die Testung auf zytotoxische Antikörper wurde im Schnitt 20 Tage nach der Transfusion durchgeführt und einmal kontrolliert.

Im Serum von 26 der 36 nachuntersuchten Empfänger (72,2 %) waren keine lymphozytotoxischen Antikörper nachweisbar. Bei vier weiteren Patienten

(11,1 %) waren bereits vor der ersten Thrombozytentransfusion HLA-Antikörper festgestellt worden; nach den Transfusionen blieb jedoch in diesen vier Fällen der Anteil positiv reagierender Testzellen konstant. Aus der Tatsache, daß der Anteil positiver Reaktionen post transfusionem keine Erhöhung aufwies, wurde geschlossen, daß in diesen vier Fällen ebenfalls keine in Zusammenhang mit der Thrombozytentransfusion stehende Neubildung zytotoxischer Antikörper stattgefunden hatte. Demgemäß war bei 30 der 36 Patienten (83,4 %) keine Bildung lymphozyto- toxischer Antikörper nach Thrombozytentransfusion zu verzeichnen.

Im Serum von 6 der 36 Patienten (16,6 %) wurde im Vergleich zur Antikörpertestung prae transfusionem ein Anstieg des Anteiles positiver Reaktionen auf HLA-Antikörper beoabachtet (Tab. 17).

Tab. 17
HLA-Antikörperbildung nach Thrombozytentransfusion

	n	%
Keine Antikörperbildung	30	83.4
Antikörperbildung	6	16.6
gesamt	36	100.0

Von den sechs Patienten, bei denen eine Antikörperbildung nach Thrombozytentransfusion ermittelt worden war, zeigten drei Patienten Anstiege des Anteils positiver Reaktionen um 2 % bis 6 %, während die drei übrigen Patienten bei negativem Antikörpertest prae transfusionem Anstiege von 84 % bis 100 % aufwies (Tab. 18).

Tab. 18

HLA-Antikörperbildung nach Thrombozytentransfusion
Prozentuale Anteile positiv reagierender Testlymphozyten

Patient	Antikörperreaktion		Anstieg
	vor Transf.	nach Transf.	
B.M.	neg.	2 %	+ 2 %
S.R.	neg.	6 %	+ 6 %
L.A.	6 %	10 %	+ 4 %
J.S.	neg.	84 %	+84 %
G.J.	neg.	96 %	+96 %
N.R.	neg.	100 %	100 %

Zusammenfassend wiesen demnach 6 von 36 Empfänger (16,6 %) einen Antikörperanstieg post transfusionem auf, während bei 30 der 36 Patienten (83,4 %) keine Bildung zytotoxischer Antikörper nach Transfusion HLA-angepaßter Zellseparatorkonzentrate erfolgte.

3.4.3 Transfusionsfrequenz und HLA-Antikörper

Der Einfluß der Frequenz erfolgter Thrombozytentransfusionen auf die Bildung lymphozytotoxischer Antikörper wurde anhand eines Vergleiches der Transfusionsfrequenzen bei immunisierten und nicht immunisierten Konzentratempfängern untersucht.

Die 6 immunisierten Patienten erhielten insgesamt 96 Transfusionen (Range: 8 bis 24), was einer durchschnittlichen Transfusionsfrequenz von 16 (St.Abw.: 7,7) entspricht.

Im Kollektiv der 30 nichtimmunisierten Patienten waren 290 Transfusionen (Range: 1 bis 42) zu verzeichnen, wobei die mittlere Transfusionsfrequenz bei 10 (St.Abw.: 8,1) lag.

Tab. 19
Frequenz der Thrombozytentransfusionen bei immunisierten und nicht immunisierten Patienten

Patientenkollektiv	n	Thrombozytentransfusionen	
		n	Mittelwert
Immunisierte Patienten	6	96	16
Nicht immun. Patienten	30	290	10
	36	386	11

Insgesamt hatten die 36 untersuchten Patienten 386 Transfusionen erhalten. Der Mittelwert lag bei 11 (St.Abw.: 8,3) Transfusionen, der Median betrug 8,5.

Im x^2-Test nach YATES wurde geprüft, ob die Empfänger von weniger als 8,5 Transfusionen (Median) ein geringeres Risiko der Immunisierung trugen als Empfänger von mehr als 8,5 Transfusionen. Es wurde jedoch keine signifikante Abweichung festgestellt (Tab. 20).

Tab. 20
Immunisierungsreaktionen bei weniger als 8.5 Transfusionen (Median) und mehr als 8.5 Transfusionen

Patientenkollektiv	< 8.5 Transfusionen	> 8.5 Transfusionen	
Immunisierte Patienten	2	4	6
Nicht immun. Patienten	16	14	30
	18	18	36

3.4.4 Präsenz des HLA-A2-Antigenes

Als möglicher Einflußfaktor kommt ferner die von DUQUESNOY (et.al.104) beobachtete starke Immunogenität des HLA-A2-Antigens in Frage (vgl. dazu S 23). Von den 6 immunisierten Patienten trugen 5 in ihrem HLA-Phänotyp das HLA-A2-Antigen (83,3 %), während von 30 Patienten ohne Antikörperneubildung 17 HLA-A2-Träger waren (56,6 %).

Tab. 21
Immunisierungsreaktionen bei HLA-A2-positiven und HLA-A2-negativen Konzentratempfängern

Patientenkollektiv	A2 positiv	A2 negativ	
Immunisierte Patienten	5	1	6
Nicht immun. Patienten	17	13	30
	22	14	36

Diese Daten zeigten im x^2-Test nach YATES keine signifikante Häufung einer Immunisierungsreaktion bei HLA-A2-Antigenträgern gegenüber Nicht-Trägern des HLA-A2-Antigens. Ein Einfluß des stark immunogenen HLA-A2-Antigens auf die ermittelten Immunisierungsreaktionen ist daher nicht wahrscheinlich.

3.4.5 HLA-Antikörper-Spezifität

Es wurde geprüft, ob unter den Patienten mit positiver Antikörperreaktion eine Spezifität des HLA-Antikörpers festzustellen war, die in Zusammenhang mit den verabreichten Thrombozytenkonzentraten gestanden haben könnte.

Bei einem der immunisierten Empfänger war eine Spezifität des zytotoxischen Antikörpers nachzuweisen. Im LCT reagierten die Antikörper des Patienten signifikant häufiger mit HLA-B7-Testlymphozyten als mit anderen Testzellen (x^2-Test nach YATES). Die Antikörperspezifität HLA-B7 konnte jedoch nicht durch Spender-Mismatches bei der Thrombozytentransfusion erklärt werden (Abb.22).

Fallbeschreibung
Beispiel eines Konzentratempfängers mit spezifischem HLA-Antikörper
Pat.Nr. 41, L.A., 45 J., AML

Datum	AK - Test positiv	Spez.	HLA-A 1	HLA-A 2	HLA-B 8	HLA-B 17.1	Transf. n
06.11.80	6%						
06.11.80			1		8		
18.11.80							9
19.11.80				2		17	
21.11.80							2
29.11.80			1		8		
02.12.80							4
03.12.80			1		8	17	1
04.12.80	10%	B7					

Keiner der verwendeten Spender führte das HLA-B7-Antigen. Ein Einfluß der Thrombozytentransfusion auf die Bildung des gegen HLA-B7 gerichteten Antikörpers ist daher auszuschließen.

3.4.6 Immunsuppressive Therapie

Ein denkbarer Einfluß immunsuppressiver Therapie im Sinne einer Verhinderung der Alloimmunisierung war nicht festzustellen. Auch Patienten, die einer immunsuppressiven Therapie unterzogen wurden, entwickelten zytotoxischer Antikörper.

3.4.7 Vorausgegangene Transfusionen

Die Transfusionsanamnesen lieferten bei drei Patienten Hinweise auf vorangegangene massive Transfusionen. Bei diesen drei Patienten handelte es sich um diejenigen Empfänger, bei denen eine extrem hohe Antikörperbildung, gemessen am Anstieg des Anteils positiver Reaktionen mit den Testlymphozyten festgestellt worden war.

In einem Fall erfolgten fünf, in einem anderen Fall lediglich zwei Thrombozytentransfusionen mit einer Immunisierungsreaktion von 100 % und 84 % reagierender Zellen. Die Transfusionsanamnesen zeigten, daß gleichzeitig im Schnitt 12 Erythrozytenkonzentrate und 3 plättchenreiche Plasmen transfundiert worden waren. Es scheint daher berechtigt, in diesen Fällen einen Einfluß der Erythrozyten- und Plasma-Transfusionen auf die Immunisierung zu unterstellen (Tab. 23, 24).

Tab. 23 Fallbeschreibung
Pat.Nr. 23, G.J., 54 J., CML

		HLA- A A	B B		Mismatch A / B
		2 26	17	W22.1	
Datum	Antikörpersuche	Spender-HLA-Typ			
06.10.80	negativ				
14.10.80		2	W35	W22.1	0 1
16.10.80		2	W35	W22.1	0 1
16.12.80	84% multispez.				

Transfusionsanamnese 06.10.80 bis 16.12.80:

9 Erythrozytenkonzentrate
3 Plättchenreiche Plasmen

Tab. 24 Fallbeschreibung
Pat.Nr. 51, N.R., 22 J., CML

Datum	Antikörpersuche	HLA-A A B B 2 3 13 27 Spender-HLA-Typ	Mismatch A / B
06.11.80	negativ		
06.11.80		2 W33 13 27	1 0
18.11.80		2 W30 7 13	1 1
20.11.80		2 W30 7 13	1 1
21.11.80		2 W30 7 13	1 1
24.11.80		2 W30 7 13	1 1
02.12.80	100%multispez.		

Transfusionsanamnese 06.11.80 bis 02.12.80:
15 Erythrozytenkonzentrate
3 plättchenreiche Plasmen

In einem dritten Fall schließlich war ein Anstieg der positiven Reaktionen auf die Testlymphozyten von negativ auf 58 % multispezifisch erfolgt, bevor erstmals Thrombozytenkonzentrate transfundiert wurden. Allerdings waren in der Zwischenzeit 1 Vollblut-, 12 Erythrozytenkonzentrat- und 9 plättchenreiche Plasmatransfusionen erfolgt.

In diesem Fall konnte daher der Einfluß der Thrombozytentransfusion auf die Immunisierungsreaktion ausgeschlossen werden, während sich gleichzeitig Hinweise auf den immunisierenden Einfluß der Transfusion anderer Blutpräparationen ergaben (Tab. 25).

Tab. 25 Fallbeschreibung
Pat.Nr. 30, J.E., 65 J., CML

Datum	Antikörpersuche
15.04.80	negativ
13.05.80	58% multispezifisch

Thrombozytenkonzentrate erst ab 13.05.80

Transfusionsanamnese 15.04.80 bis 13.05.80:

1 Vollblutkonserve
12 Erythrozytenkonzentrate
9 Plättchenreiche Plasmen

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1 Spendernebenwirkungen

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist die Tatsache, daß sich hinsichtlich der untersuchten Parameter keine Hinweise auf eine mögliche Gefährdung der Spender durch die Intermittierend Fließende Thrombopherese mit dem Zellseparator Haemonetics Model 30 fanden.

Während der 560 beobachteten Zellseparationen waren keine ernsthaften Nebenwirkungen zu verzeichnen. Lediglich ein Fall von leichtem Unwohlsein während der Spende wurde beobachtet (1/560: 0,2 %), während alle anderen Spender angaben, sich subjektiv wohlzufühlen.

Auch die Blutbilder der Spender nach der Zellseparation blieben bei allen 560 Thrombopheresen im Bereich der Norm. Weder bei einem Spender noch bei einem Empfänger wurde nach Zellseparation eine Hepatitis beobachtet.

Die gute Verträglichkeit einer einmaligen Zellseparation ist in der Literatur belegt. Durch die Intermittierend Fließende Zytopherese ereignet sich nach Untersuchungen von MAGUIRE et.al. (57) ein kurzfristiger Thrombozytenabfall um durchschnittlich 30.000/mm³, der nach drei bis vier Tagen den Ausgangswert erreicht.

Thrombozytenadhäsivität und Blutungszeit werden dabei nicht signifikant beeinflußt (BUCHHOLZ et.al.14). Eine Komplementaktivierung, die bei der Filtrationszytopherese beschrieben wurde und zu einer länger anhaltenden Neutrophilie führt, ist bei der Intermittierenden Zytopherese nicht zu verzeichnen (STRAUSS et.al.79). Außer einer durch Hämodilution erklärten kurzfristigen Neutropenie bleiben die Leukozytenzahlen und Leukozytenfunktion im Normbereich.

Auch zur mehrfach wiederholten Zellseparation bei einem Spender liegen verschiedene Studien vor. COHEN et.al. (17) fanden bei Spendern, die mindestens vier Zytopheresen pro Woche unterzogen

wurden, keine klinischen oder laboratoriums-medizinischen Normabweichungen. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung lag die individuelle Spenderleistung im Schnitt bei fünf täglich aufeinanderfolgenden Spenden, wobei in 32 Fällen die Seriendauer zwischen sechs und 19 Tagen lag. Nach dieser im Vergleich zu COHEN höheren Spenderleistungen ergaben sich bei den 560 beobachteten Spenden keine Normabweichungen. BUCHHOLZ et.al. (14) fanden, daß die Thrombozytenwerte bei Mehrfachspendern nach der ersten Spende um 30.000/mm³ fallen, um sich bei den anschließenden Zellseparationen nur noch in wesentlich geringerem Maße zu verändern, sodaß Mehrfachspenden hinsichtlich der Thrombozytenzahlen ohne Spendergefährdung möglich seien.

Das Verhalten der Thrombozytenwerte bei Mehrfachspendern mit dem Zellseparator Hamonetics Modell 30 untersuchten LASKY et.al. (51). Sie ermittelten bei einem Thrombozytenausgangswert von über 150.000/mm³ und nach mindestens vier Zellseparationen bei 1,3 % der Spender einen Thrombozytenabfall unter 100.000/mm³. Bei den hier untersuchten 560 Spenden zeigte sich demgegenüber in keinem Fall ein Absinken der Thrombozytenwerte nach wiederholter Zellseparation unter 150.000/mm³.

Als mögliche Erklärung dieser Ergebnisse kommen die Auswahl der Spender und die spenderschonende Handhabung des Separationsverfahrens in Frage.

In den Spenderpool wurden lediglich kontrollierte Dauerspender aufgenommen, die bereits mehrfach komplikationslos Vollblut- und Plasmaspenden geleistet hatten und deren regelmäßige Dauerüberwachung keine Normabweichungen gezeigt hatte.

Das Separationsverfahren selbst wurde an der Blutbank der Universität Düsseldorf mit dem Ziel einer größtmöglichen Spendersicherheit gehandhabt.

Neben der üblichen Verwendung von Einmal-Bestecken zur Infektionsprophylaxe und der oben geschilderten Dauerüberwachung wurde die Zellseparation auf höchstens zwei Durchgänge begrenzt.

Wenn auch die mit einer extensiveren Zytopherese verbundenen Ausbeuten nicht erreicht werden -vgl. dazu S. 82-, so scheint der Verzicht auf eine vorherige medikamentöse Spenderkonditionierung und die Begrenzung der Separation auf zwei Durchgänge im Gegensatz zu Techniken mit bis zu 8 Durchgängen (STRAUSS et.al.78) einen positiven Einfluß auf die Spendersicherheit auszuüben.

Die Untersuchung des Verhältnisses von B-Lymphozyten zu T-Lymphozyten nach wiederholter Zellseparation wurde angeregt durch eine Untersuchung von KOEPKE et.al. (46), in der sich Hinweise für eine Verschiebung des T-/B-Zell-Verhältnisses nach Zellseparation zugunsten der T-Lymphozyten ergaben. KOEPKE ermittelte die T-/B-Zell-Ratio bei 10 Spendern nach zehn wöchentlichen Zytopheresen mit dem Haemonetics Model 30 Zellseparator. Er fand bei der Hälfte der Spender eine signifikante Verminderung des B-Lymphozytenanteiles auf durchschnittlich 7,2 % der Gesamtlymphozytenzahl bei gleichbleibender absoluter Lymphozytenzahl.

Die eigenen Untersuchungen bezogen 12 Spender ein, die unterschiedlich häufig gespendet hatten, wobei sowohl einmalige Spender als auch solche nach über 35 Zellseparationen ausgesucht wurden, um einen möglichen Einfluß der Spendefrequenz erfassen zu können.

Bei einem mittleren B-Lymphozytenanteil von 12 % an der Gesamtlymphozytenzahl zeigte sich in nur einem Fall ein unter 10 % erniedrigter B-Zell-Anteil, während KOEPKE et.al. (46) bei fünf von zehn Spendern ein Absinken der B-Lymphozyten von durchschnittlich 12 % auf 5 % nach wiederholter Thrombopherese verzeichneten.

Auffallend ist die Tatsache, daß der gemessene B-Zell-Anteil nach Zytopherese in dieser Untersuchung mit dem von KOEPKE et.al. (46) ermittelten Normalwert vor Zellseparation auffallend übereinstimmt (beides 11,8 %). Dies macht einen möglichen Einfluß der Spenderauswahl und der Untersuchungsmethode auf die unterschiedlichen Ergebnisse wenig wahrscheinlich. Als möglichen Grund für die abweichenden Ergebnisse kommt der Einfluß der Zellseparationstechnik in Frage. Wie weiter oben er-

läutert, wurde die Zellseparation bei den untersuchten Spendern auf zwei Zyklen mit einer Ausbeute von 1.2 bis $2.0 \cdot 10^9$ Lymphozyten beschränkt.

Demgegenüber wurden in der Studie von KOEPKE et.al. (46) je Spende annähernd 2 bis $5 \cdot 10^9$ Lymphozyten in sechs Zyklen gewonnen. Es scheint möglich, daß diese höhere Zellausbeute je Konzentrat mit einem Absinken des B-Lymphozytenanteils bei Mehrfachspendern in Verbindung steht. Aus dem Vergleich beider Untersuchungen ergaben sich daher Hinweise darauf, daß die Erhöhung der Zellausbeute bei der Intermittierend Fließenden Zytopherese mit einer Erhöhung des Risikos eines überdurchschnittlichen Abfalles des B-Lymphozytenanteiles bei Mehrfachspendern in Verbindung stehen könnte.

Weitere Untersuchungen bei einem größeren Spenderkollektiv sind jedoch unbedingt notwendig. Dabei könnte insbesondere die Fragestellung Beachtung finden, inwieweit die bei der Zellseparation erzielte Lymphozytenausbeute einen Einfluß auf die Lymphozytenzahlen und auf das Verhältnis von B- zu T-Lymphozyten ausübt.

Faßt man die Untersuchungen zur Spendersicherheit zusammen, so ergaben sich anhand der untersuchten Parameter keine Hinweise auf Risiken für Spender, die der Intermittierend Fließenden Zellseparation nach der an der Blutbank der Universität Düsseldorf angewandten Methode wiederholt unterzogen werden.

4.2 Untersuchungen der Thrombozytenkonzentrate

Die Untersuchungen zur Zusammensetzung der Zellseparatorkonzentrate galten der Beantwortung der Frage, in welcher Größenordnung die Thrombozyten durch das beschriebene Thrombopherese-Verfahren angereichert werden.

Im Durchschnitt wurde eine Plättchenkonzentration von $1.4 \cdot 10^{11}$ Thrombozyten je Konzentrat erreicht, wobei eine Standardabweichung von $0.8 \cdot 10^{11}$ verzeichnet wurde. Die Leukozytenkontamination betrug $1.5 \cdot 10^{9}$ (St.Abw.: $0,6 \cdot 10^{9}$) je Konzentrat. Die recht weite Streuung der Zell-

ausbeuten ist auch von anderen Autoren beschrieben (DALY et.al.21). Sie wird in Zusammenhang gebracht mit Unterschieden in der Wahl des Zeitpunktes, zu dem bei der Thrombopherese die Zufuhr des Spenderblutes in die Zentrifuge verlangsamt und der Sammelvorgang der Thrombozyten-Leukozyten-Schicht begonnen wird. Daraus resultiert eine wechselnd exakte Trennung der einzelnen Sedimentationsschichten, wodurch es zu einer unterschiedlich hohen Erythrozyten- und Plasma-Kontamination des Konzentrates kommt.

Ein wichtiges Untersuchungsergebnis ist die Feststellung, daß die Thrombozytenausbeute durch einen zweiten Sammelzyklus je Spende verdoppelt werden kann, ohne daß für den Spender nachteilige Folgen beobachtet wurden.

Diese Feststellung hatte zur Konsequenz, daß seitdem an der Blutbank der Universität Düsseldorf generell zwei Sammelzyklen je Thrombopherese empfohlen werden. Bei den weiteren Erörterungen der Konzentratuntersuchungen wird daher auf die Zellausbeute nach zwei Sammelzyklen Bezug genommen.

Verschiedene andere Autoren haben die Thrombozytenausbeute mit dem "Haemonetics Model 30 Blood Processor" untersucht. Tab. 26 zeigt die ermittelten Konzentratausbeuten.

Tab. 26
Überblick über Thrombozytenausbeuten verschiedener Autoren mit dem Haemonetics Model 30 Zellseparator

Autoren	Thr.-Ausbeute	Zyklen/Zusätze
Schiffer et. al. (78)	$3.45 \cdot 10^{11}$	8 / HES
Strauss et. al. (84)	$3.06 \cdot 10^{11}$	8 / HES
Nusbacher et. al. (67)	$2.51 \cdot 10^{11}$	2 / Ø
Kuntz,Wollenhaupt,Brüster (47)	$2.10 \cdot 10^{11}$	2 / Ø
Daly et. al. (21)	$1.91 \cdot 10^{11}$	2 / Ø
Aisner et. al. (2)	$1.86 \cdot 10^{11}$	2 / Ø
Huestis et. al. (42)	$1.60 \cdot 10^{11}$	2 / Ø

Der Vergleich der Untersuchungsergebnisse zeigt eine Streuung der Thrombozytenausbeuten von $1.6 \cdot 10^{11}$ bis $3.45 \cdot 10^{11}$. Dabei läßt sich eine Unterscheidung der Zellausbeuten nach Separationstechniken vornehmen. Während bei zwei Sammelzyklen je Spende zwischen $1.6 \cdot 10^{11}$ und $2.5 \cdot 10^{11}$ Plättchen angereichert wurden, konnte die Ausbeute bei Anwendung von Hydroxyäthyl-Stärke und acht Sammelzyklen auf über $3 \cdot 10^{11}$ Thrombozyten gesteigert werden.

Die Anwendung von Hydroxyäthyl-Stärke (HES) bei der Zellseparation ist derzeit noch Gegenstand der Diskussion. HES ist ein dem Dextran ähnliches Glucose-Polymer, das Hydroxyäthylgruppen enthält, um eine größere intravaskuläre Überlebenszeit zu erreichen (MAGUIRE et.al.58). Während der Zellseparation dient HES einer Verstärkung der Erythrozytensedimentation und bewirkt dadurch eine Erhöhung der Thrombozyten- und Leukozytenkonzentration (STRAUSS et.al.78). Auch in den in Abb.26 zitierten Arbeiten von STRAUSS et.al. (78) und SCHIFFER et.al. (72) kommt dieser Effekt einer gesteigerten Thrombozytenausbeute bei Anwendung von HES zum Ausdruck. Gleichzeitig scheint die Infusion von HES jedoch für den Spender mit Risiken behaftet.

MAGUIRE et.al. (58) ermittelten funktionelle und morphologische Thrombozytenabnormalitäten bei Spendern, die während der Zellsepartion HES erhalten hatten, während Funktion und Morphologie der Thrombozyten bei Spendern, die keinen HES-Zusatz erhalten hatten, normal waren. Wegen der Ähnlichkeit von HES mit Dextranen wird eine Verlängerung der Blutungszeit, wie sie nach Infusion von Dextranen beobachtet wird (LANGDELL et.al.50), auch nach der Applikation von HES für möglich gehalten (KARLSON et.al.45, THOMPSON et.al.87). Da HES für Wochen im Spenderblut verbleiben kann (BOON et.al.10), sind insbesondere nach wiederholter Zellseparation Gefährdungen der Spender und Funktionseinbußen der gesammelten Thrombozyten nicht auszuschließen. Von der Anwendung von HES sollte daher bis zum Vorliegen von Untersuchungen, die diese Vorbehalte auszuräumen in der Lage sind, abgesehen werden.

Bei einem Verzicht auf die Anwendung von HES und bei Beschränkung der Sammelzyklen je Separation auf zwei, ermittelten HUESTIS et.al. (42), DALY et.al. (21), AISNER et.al. (2) und NUSBACHER et.al. (67) Thrombozytenausbeuten von zwischen $1.6 \cdot 10^{11}$ und $2.5 \cdot 10^{11}$. Diese Zellausbeuten decken sich weitgehend mit den für die Blutbank Düsseldorf ermittelten Konzentrationen nach zwei Sammelzyklen.

Nach Untersuchungen von GRUMET et.al. (38) und LOHRMANN et.al. (56) benötigt der durchschnittliche nichtimmunisierte Erwachsene zur Gewährleistung einer adäquaten Hämostase die Transfusion von 0.5 bis $1 \cdot 10^{11}$ Thrombozyten pro die. Mit der Transfusion derartiger Thrombozytendosen wird die Blutungszeit eines thrombozytopenischen Empfängers entscheidend verkürzt und die Frequenz lebensbedrohlicher Blutungen signifikant vermindert (DJERASSI et.al.24; FREIREICH et.al.33).

Da die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen ermittelten Thrombozytenausbeuten den von LISTER et.al. (55) empfohlenen Standard von $1 \cdot 10^{11}$ Thrombozyten noch übersteigen, darf angenommen werden, daß die angewendete Pheresetechnik zur Erzielung eines Transfusionseffektes ausreichende Konzentrationen ermöglicht.

Zusammenfassend wurde aus den Konzentratuntersuchungen geschlossen, daß die an der Blutbank der Universität Düsseldorf gewonnenen Zellseparatorkonzentrate die Anforderungen an Thrombozytenkonzentrate hinsichtlich ihrer Zusammensetzung erfüllen und mit der beschriebenen Technik ausreichende Thrombozytendosen gewonnen werden.

4.3 Immunologische Spenderauswahl

Da die Effektivität der Transfusion von Thrombozytenkonzentraten an nicht-immunisierte Empfänger gesichert ist, wurde bisher eine Spenderauswahl unter Berücksichtigung des HLA-Systems erst nach der Entwicklung einer Alloimmunisierung mit Refraktärität vorgenommen. Neben dem finanziellen und technischen Aufwand der Immunologischen Spenderauswahl galt die Suche nach HLA-kompatiblen Spendern wegen der geringen Verbreitung einzelner HLA-Antigene als schwierig. Nach Schätzungen von OPELZ et.al. (68) bedarf eines Pools von 50.000 HLA-typisierten Spendern, um für jeden denkbaren HLA-Phänotyp mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % zehn HLA-identische Spender anbieten zu können. Da diese Größenordung die Kapazität einzelner Spendezentralen übersteigt, ist an die Errichtung nationaler oder supranationaler Spenderpools, ähnlich der EUROTRANSPLANT-Zentrale gedacht worden (JEANNET 44; GRAW et.al.37).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Transfusionsstrategie umfaßte demgegenüber den Versuch, schon für die erste Transfusion von Zellseparatorkonzentraten auf HLA-angeglichene Spender zurückzugreifen.

Dieses Vorgehen stützt sich u.a. auf folgende Überlegungen.

Die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten unterliegt einer strengen Indikation und ist auf Zustände schwerer Thrombopenie mit nicht anderweitig beherrschbarer Blutungsneigung beschränkt. Da eine umfassende Transfusionsanamnese in der Praxis häufig nicht zu erheben ist, bleibt vor der ersten Transfusion meist unklar, ob der Empfänger bereits gegen HLA-Antigene sensibilisiert ist. Bislang blieben Versuche, die Immunitätslage vor der Transfusion durch serologische Verfahren zu ermitteln, weitgehend unbefriedigend (DALY et.al.21). Die Spenderauswahl nach dem HLA-System ist anderen Auswahlmethoden, wie Cross-matching von Thrombozyten und Leukozyten, überlegen und bietet die größten Chancen, einen positiven Transfusionseffekt zu erzielen (FILIP et.al.32).

Auch vergleichsweise niedrige Thrombozytendosen und wenige Transfusionen können zur Bildung zytotoxischer Antikörper führen, da die Entwicklung einer Alloimmunisierung keine signifikante Korre-

lation zur transfundierten Thrombozytendosis zeigt (DUTCHER et.al.31).

Die Transfusion von nicht ausgewählten Thrombozytenkonzentraten führt eher zur Immunisierung als die Transfusion von Zellen HLA-angeglichener Spender (MÜLLER-ECKARDT 64). Demgegenüber verzögert die Beschränkung auf möglichst wenige HLA-angeglichende Spender die Alloimmunisierung der Empfänger (SINTNICOLASK et.al.74.).

Schließlich würde die Transfusion eines Thrombozytenkonzentrates von Normalspendern bei einem bereits immunisierten Empfänger nicht zu dem erwarteten Plättchenanstieg führen (TEJADA et.al.84), sodaß bei folgenden Transfusionen auf HLA-angeglichene Spender zurückgegriffen werden müßte.

Die Untersuchung der bei 560 Transfusionen erreichten Spender-Empfänger-Konstellationen im HLA-System dienten der Beantwortung der Frage, welcher Übereinstimmungsgrad zwischen Spender und Empfänger mit dem zur Verfügung stehenden Spenderpool erreicht werden konnte.

Die Ergebnisse wurden im einzelnen auf den Seiten 53 ff. dargestellt. Ein wichtiges Ergebnis der Untersuchung ist die Feststellung, daß 23,6 % der Thrombozytentransfusionen (132/560) unter Erzielung einer "full-house"-identischen Konstellation durchgeführt werden konnten.
Ferner soll hervorgehoben werden, daß bei insgesamt 283 Transfusionen (68,4 %) eine HLA-B-Locus-Identität erreicht wurde. Seit den Untersuchungen von DUQUESNOY et.al. (28,29) ist bekannt, daß die B-Locus-Antigene die stärkste Immunogenität im HLA-System besitzen und besonders häufig zur Immunisierung führen.

Insgesamt wiesen 68,4 % der Transfusionskonstellationen keine Mismatches von Spender und Empfänger auf dem HLA-B-Locus auf.

Diese Ergebnisse der immunologischen Spenderauswahl können als günstig angesehen werden (Diskussion zu KUNTZ et.al.47).

Als mögliche Gründe für diese Ergebnisse kommen u.a. folgende Möglichkeiten in Betracht.

Die Verwendung von Spendern mit phänotypisch nur zwei nachgewiesenen HLA-Antigenen ermöglichte auch bei Empfängern, deren HLA-Phänotypen durch Kombination eines häufigen mit seltenen HLA-Antigenen in der Bevölkerung wenig verbreitet sind, die Vermeidung von Mismatches (vgl. dazu S. 58 f.).

Desweiteren wurden ungünstig angeglichene Spender möglichst schnell abgelöst, während gut angepaßte Spender wiederholt der Thrombopherese unterzogen wurden. Daß ein nicht unerheblicher Teil der Spender aus diesem Grund mehrmals verwendet wurde, belegt die Tatsache, daß es bei 560 Transfusionen lediglich zu 186 verschiedenen Spender-Empfänger-Konstellationen kam (vgl. dazu S. 59 f.).

Insgesamt scheint der an der Blutbank der Universität Düsseldorf zur Verfügung stehende Pool HLA-typisierter Spender für die Spenderauswahl nach dem HLA-System in der Mehrzahl der Fälle genügend günstige Spender-Empfänger-Konstellationen zu ermöglichen.

Dennoch wäre eine weitere Vergrößerung des Pools wünschenswert, um auch für Empfänger mit seltenen HLA-Phänotypen bestmöglich angepaßte Spender aussuchen zu können.

4.4 Ergebnisse der HLA-Antikörpersuche

Durch den Mikrolymphozytotoxizitätstest konnte nachgewiesen werden, daß bei den untersuchten Empfängern von Thrombozytenkonzentraten in 10.9 % der Fälle (6/55) bereits vor der ersten Transfusion von Zellseparatorkonzentraten zytotoxische Antikörper zirkulierten, wobei im Schnitt bei 36,3 % der Testzellen positive Reaktionen beobachtet wurden.

Aus diesen Ergebnissen wurden folgende Feststellungen abgeleitet:

Bei 10 % der untersuchten Empfänger bestand vor der ersten Transfusion von Thrombozytenkonzentraten eine Alloimmunisierung gegen HLA-Antigene; die Transfusion der Zellseparatorkonzentrate kann daher nicht Ursache der Immunisierungsreaktion gewesen sein.

Als Ursachen für eine Sensibilisierung gegen HLA-Antigene kommen vorangegangene Schwangerschaften und Bluttransfusionen in Frage. Mög-

licherweise haben in den angesprochenen Fällen frühere Transfusionen von Vollblut- oder unausgewählten plättchenreichen Plasmapräparationen zur Sensibilisierung gegen HLA-Antigene geführt.

Die bei einem nicht unerheblichen Anteil der Empfänger von Thrombozytenkonzentraten bereits vor der Transfusion bestehende Immunisierung gegen HLA-Antigene sollte bei der Wahl der Transfusionsstrategie berücksichtigt werden. Wegen der geschilderten Vorteile HLA-kompatibler Thrombozytentransfusionen ist zu fordern, schon bei der ersten Transfusion von Zellseparatorkonzentraten auf HLA-kompatible Spender zurückzugreifen, sofern nicht eine bestehende Immunisierung gegen HLA-Antigene mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Zumindest sollten aber leukozytenarme Plättchenkonzentrate Verwendung finden, um eine möglicherweise bereits bestehende Sensibilisierung gegen HLA-Antigene nicht zu verstärken.

Zur Beantwortung der Frage, inwieweit die Thrombozytentransfusion zu einer Immunisierung der Empfänger gegen HLA-Antigene führte, konnten 36 Patienten auf die Präsenz zytotoxischer Antikörper nachuntersucht werden. Bei 83.4 % der untersuchten Empfänger (30/36) war keine Bildung zytotoxischer Antikörper nach Thrombozytentransfusion festzustellen. 16.6 % der Empfänger (6/36) zeigten nach Transfusion im Vergleich zum Ausgangswert positive bzw. verstärkte zytotoxische Reaktionen. Die Höhe des Anteils positiver Reaktionen mit den Testlymphozyten unter den immunisierten Patienten wies auffallende Unterschiede auf. Während die eine Hälfte der antikörperpositiven Patienten im LCT einen Reaktionsanstieg um durchschnittlich 4 % (2 % bis 6 %) zeigte, reagierte die andere Hälfte nach der Transfusion im LCT mit positiven Reaktionen von 84 % bis 100 % im Sinne einer multispezifischen Alloimmunisierung.

Um diese Ergebnisse möglicherweise erklären zu können, wurden verschiedene Einflußfaktoren näher untersucht.

Spender-Empfänger-Konstellationen

Der Einfluß der Spender-Empfänger-Konstellationen im HLA-System auf das Ausmaß der Immunisierung der Empfänger von Thrombozytentransfusionen gilt als gesichert (vgl. dazu S. 20 ff.). Je größer die Anzahl abweichender HLA-Antigene der Spender, desto eher kommt es zur Bildung zytotoxischer Antikörper.

In der vorliegenden Untersuchung waren bei den 30 nicht immunisierten Patienten im Mittel 1,14 abweichende HLA-Antigene je Transfusion zu verzeichnen, während bei den 6 immunisierten Patienten durchschnittlich 1,23 Mismatches je Transfusion festgestellt wurden. Die Differenz zwischen den beiden Kollektiven ist im Vergleich zu anderen Studien (TEJADA et.al.84, DUQUESNOY et.al.28) gering.

Dies könnte möglicherweise begründet sein in der Tatsache, daß in der vorliegenden Untersuchung bei allen Transfusionen bestmöglich HLA-angepaßte Spender ausgesucht worden waren. Die zitierten anderen Studien waren demgegenüber als randomisierte Vergleichsstudien konzipiert, sodaß anhand größerer Kollektive der Einfluß abweichender HLA-Antigene bei Spendern und Empfängern auf das Ausmaß der Immunisierung statistisch einwandfrei nachgewiesen werden konnte.

Aufgrund des gesicherten Zusammenhangs zwischen Spender-Empfänger-Konstellationen im HLA-System und Immunisierungsreaktionen kann jedoch für diejenigen Fälle, in denen keine anderen Ursachen für eine Immunisierung der Empfänger ermittelt werden können, der Einfluß von im Einzelfall ungünstig wirkenden, zur Alloimmunisierung führenden Mismatch-Konstellationen nicht ausgeschlossen werden. Gleichzeitig bleibt jedoch darauf hinzuweisen, daß die mittleren Mismatch-Konstellationen bei beiden Kollektiven nur eine geringe Differenz aufweisen.

Präsenz des HLA-A2-Antigens

DUQUESNOY et.al. (30) wiesen nach, daß das HLA-A2-Antigen eine besonders starke Immunogenität besitzt und häufiger zur Bildung zytotoxischer Antikörper führt als andere HLA-Antigene. In der vorliegenden Untersuchung war jedoch keine signifikante Häufung des HLA-A2-Antigens im Kollektiv der immunisierten Patienten festzustellen, sodaß ein Einfluß dieses Faktors auf die Antikörper- bildung nicht wahrscheinlich ist.

Frequenz der Thrombozytentransfusion

Eine signifikante Korrelation zwischen der Frequenz der Thrombozytentransfusion und der Bildung zytotoxischer Antikörper war nicht nachzuweisen. Die immunisierten Empfänger hatten nicht signifikant häufiger Zellseparatorkonzentrate erhalten als die Empfänger ohne nachfolgende Antikörperbildung. Dies entspricht den Feststellungen von DUTCHER et.al. (31), daß keine signifikante Korrelation zwischen der Thrombozytendosis, entsprechend der Transfusionsfrequenz, und dem Ausmaß der Immunisierung existiert.

Grundsätzlich steigt zwar das Risiko der Alloimmunisierung mit der Zahl der Thrombozytentransfusionen, diese Entwicklung folgt jedoch nicht einer engkorrelierten Beziehung. Auch nach wenigen Transfusionen besteht die Möglichkeit der Antikörperbildung gegen HLA-Antigene.

Vorausgegangene Schwangerschaften

Durch Schwangerschaft kann es zu einer Sensibilisierung der Mutter gegen HLA-Merkmale der väterlichen Lymphozyten, die an das Kind vererbt werden, kommen.

Die Anamnese der immunisierten Patienten war in Bezug auf vorausgegangene Schwangerschaften jedoch leer, sodaß dieser Einflußfaktor ausgeschlossen werden konnte.

Vorausgegangene Transfusionen

Die Transfusionsanamnesen ergaben in drei Fällen Hinweise auf massive Transfusionen als möglichen Einflußfaktor für die Immunisierungsreaktionen. Bei zwei Patienten war ein Ausstieg des Antikörpers von Null auf 84 % und 100 % beobachtet worden, obwohl in der Zwischenzeit lediglich zwei bzw. fünf Thrombozytentransfusionen erfolgt waren.

Da die Patienten gleichzeitig jedoch durchschnittlich 12 Erythrozytenkonzentrate und 3 plättchenreiche Plasmen erhalten hatten, scheint ein Einfluß der Thrombozytentransfusion weniger, ein Einfluß der Transfusion anderer Blutpräparationen hingegen eher wahrscheinlich.

In einem weiteren Fall war nach noch massiverer Transfusion anderer Blutpräparationen der Antikörperanstieg von Null auf 100 % beobachtet worden, bevor erstmals Thrombozytenkonzentrate transfundiert wurden. Hierdurch konnte demnach ein Einfluß der Thrombozytentransfusion mit Sicherheit ausgeschlossen werden, während sich Hinweise auf den Einfluß anderer Transfusionen ergaben.

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß bei den drei Empfängern von Zellseparatorkonzentraten, bei denen eine hohe Antikörperbildung beobachtet wurde, die Thrombozytentransfusion als Ursache wenig wahrscheinlich ist. Demgegenüber scheinen in den dargestellten Fällen Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten und/oder plättchenreichen Plasmapräparationen unausgewählter Spender eine Rolle bei der Bildung von HLA-Antikörpern gespielt zu haben.

Weitere Untersuchungen zur Bedeutung derartiger Transfusionen für Immunisierungsreaktionen gegen HLA-Antigene sind unbedingt erforderlich. Wenn die Transfusion der angesprochenen Präparationen allgemein das Risiko zur Bildung zytotoxischer Antikörper bergen sollte, wäre zu überlegen, ob zur Verhinderung der Alloimmunisierung bei Risikopatienten auch für derartige Transfusionen eine immunologische Spenderauswahl nach dem HLA-System von Nutzen wäre.

Antikörper-Spezifität

Bei einem weiteren der immunisierten Patienten konnte aufgrund der Spezifität des Antikörpers gegen HLA-B7 ein Einfluß der Thrombozytentransfusion mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da die zur Zellseparation herangezogenen Spender nicht über das HLA-B7-Antigen verfügten.

Bei zwei immunisierten Patienten mit Antikörperanstiegen von +6 % und +2 % konnten andere Einflußfaktoren nicht festgestellt werden, sodaß die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten als Ursache der gemessen am Antikörperanstieg jedoch geringen Alloimmuniserung nicht unwahrscheinlich ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß bei 30 von 36 nachuntersuchten Empfängern HLA-angepaßter Thrombozytenkonzentrate keine Immunisierungsreaktionen beobachtet wurden. 6 von 36 Empfängern wiesen bei der Nachuntersuchung eine Erhöhung des Antikörpers auf. In vier dieser Fälle ist eine ursächliche Beteiligung der Thrombozytentransfusion aufgrund der Transfusionanamnese, des Zeitpunktes der Antikörperbildung bzw. der Antikörperspezifität nicht wahrscheinlich.

Es ergaben sich jedoch Hinweise auf einen möglichen Einfluß der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten und/oder plättchenreichen Plasmapräparationen auf die beobachteten Immunisierungsreaktionen gegen HLA-Antigene.

Zusammenfassung

Die Zellseparation mit dem Haemonetics Modell 30 Zellseparator ermöglicht die Gewinnung von Thrombozyten in ausreichend hoher Konzentration. Auch nach wiederholter Thrombopherese ergaben sich unter Beobachtung von Blutbild und relativem B-Lymphozytenanteil an der Gesamtlymphozytenzahl keine Hinweise auf eine Gefährdung der Spender.

Die Auswahl HLA-angepaßter Spender führte in 23,6 % zur Transfusion HLA-identischer, in 44.8 % zur Verabreichung zumindest HLA-B-Locus-identischer Thrombozytenkonzentrate. Eine Bildung von HLA-Antikörpern post transfusionem wurde bei 6 von 36 nachuntersuchten Empfängern (16,6 %) festgestellt. Bei drei Empfängern mit hohem Antikörperanstieg ergaben sich Hinweise auf massive Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten und plättchenreichen Plasmen als Ursache der Immunisierung, bei einem weiteren Empfänger konnte aufgrund der Antikörperspezifität die Thrombozytentransfusion als Ursache der Immunisierung ausgeschlossen werden.

Bildung von HLA-Antikörpern wurde auch bei zytotoxischer und immunsuppressiver Therapie beobachtet. 10 % der Empfänger waren schon vor der ersten Thrombozytentransfusion gegen HLA-Antigene immunisiert.

Die Verwendung HLA-angepaßter Spender schon bei der ersten Transfusion von Thrombozytenkonzentraten scheint daher eine wünchenswerte, wirkungsvolle und effektive Maßnahme zur Verminderung von Immunisierungsreaktionen bei thrombozytopenischen Patienten, die einer Langzeitsubstitution von Thrombozyten bedürfen.

Literaturverzeichnis

1. ABRAHAMSEN A.F.
Survival of ^{51}Cr-labeled Autologous and Isologous Platelets as Differential Diagnosis Aid in Thrombocytopenic States
Scand J Haematol 7, 525-528 (1970)

2. AISNER J., SCHIFFER C.A., WOLFF J.H., WIERNIK P.H.
A Standardized Technik for Efficient Platelet and Leukocyte Collection Using the Model 30 Blood Processor
Transfusion 16, 437-445 (1976)

3. ALBERT E., AMOS D.B., BODMER W.F., CEPPELLINI J., DAUSSET J., KISSMEYER-NIELSEN F., MAYR W., PAYNE R., VAN ROOD J.J., TERASAKI P.I., WALFORD R.L.
Nomenclature for Factors of the HLA System 1980
Immunobiol 158, 307-311 (1981)

4. ALBERT E.D., SCHOLZ S., BERTRAMS J., EWALD R.W., WESTPHAL E., RATSCHKO K.W., SPIELMANN W., SEIDL S.
Representative HL-A Phenotype and Haplotype Frequencies of the German Population
Z Immun Forsch 148, 367-371 (1975)

5. ASTER R.H.
Pooling of Platelets in the Spleen: Role in the Pathogenesis of 'Hypersplenic' Thrombocytopenia
J Clin Invest 45, 645-657 (1966)

6. ASTER R.H., SZATKOWSKI N., LIEBERT M., DUQUESNOY R.J.
Expression of HLA-B12, HLA-B8, w4 and w6 on Platelets
Transplant Proc 9, 1695-1696 (1977)

7. BACH F.H., HIRSCHHORN K.
Lymphocyte Interaction: A Potential Histocompatibility Test In Vitro
Science 142, 813-814 (1964)

8. BERAH M., HORS J., DAUSSET J.
A Study of HL-A Antigens in Human Organs
Transplantation 9, 185-192 (1970)

9. BIALEK J.W., BODMER W.F., BODMER J.G., PAYNE R.
Distribution and Quantity of Leukocyte Antigens in the Formed Elements of the Blood
Transfusion 6, 193-205 (1966)

10. BOON J.C., JESCH F., RING J., MESSMER K.
Intravascular Persistence of Hydroxyethyl Starch in Man
Eur Surg Res 8, 497-503 (1976)

11. BOROVICZENY K.G.v., SCHIPPERGES H., SEIDLER E. (Hrsg.)
Einführung in die Geschichte der Hämatologie
Thieme, Stuttgart, 1974

12. BOSCH L.J., EERNISSE J.G., VAN LEEUWEN A., LOELIGER E.A., VAN ROOD J.J.
Treatment of Thrombocytopenic Patients with Repeated Platelet Transfusions
Rev Belge Path 31, 139-145 (1965)

13. BREUNING M.H., VAN DEN BERG-LOONEN E.M., BERNINI L.F., BIJESINA J.B., VAN LOGHEM E., MEERA KHAN P., NIJENHUIS L.E.
Localization of HLA on the Short Arm of Chromosome 6
Hum Genet 37, 131-139 (1977)

14. BUCHHOLZ D.H., SCHIFFER C.A., WIERNIK P.H., BETTS S.W., REILLY J.A.
Granulocyte Harvest For Transfusion. Donor Response to Repeated Leukapheresis
Transfusion 15, 96-106 (1975)

15. BUCHHOLZ D.H., SCHIFFER C.A., WIERNIK P.H., BETTS S.W., REILLY J.A.
Granulocyte Transfusion. Donor Response to Repeated Transfusion
in: Leukozytes. Separation,Collection, and Transfusion, pp. 117-189, London, Acad.Pr. 1975

16. CEPPELLINI R., CURTONI E.S., MATTIUZ P.L., MIGGIANO V., SCUDELLER G., SERRA A.
Genetics of Leukocyte Antigens. A Family Study of Segregation and Linkage
Histocompatibility Testing 1967, pp. 149-187, Copenhagen, Munksgaard, (1967)

17. COHEN M.A., OBERMAN H.A.
Safety and Long-term Effects of Plasmapheresis
Transfusion 10, 58-66 (1970)

18. COHN E.J., ONCLEY J.L., STRONG L.E.,
HUGHES W.L., ARMSTRONG S.H.
Chemical, Clinical and Immunological Studies
on the Products of Human Plasma Fractionation
J Clin Invest 23, 417-436 (1944)

19. COOMBS R.R.A., MOURANT A.E., RACE R.R.
A New Test for the Detection of Weak and
'Incomplete' RH Agglutinins
Brit J Exp Pathol 26, 255-266 (1945)

20. CRONKITE E.P., JACOBS G.J., BRECHER G.,
DILLARD G.
The Hemorrhagic Phase of the Acute Radiation
Syndrome Due to Exposure on the Whole Body to
Penetrating Ionizing Radiation
Am J Roentgenology 67, 796-804 (1952)

21. DALY P.A., SCHIFFER C.A., AISNER J.,
WIERNIK P.H.
A Comparison of Platelets Prepared by the
Haemonetics Model 30 and Multiunit Bag
Plateletpheresis
Transfusion 19, 778-781 (1979)

22. DAUSSET J.
The HL-A System. Genetics and Biological
Implications
Acta Pathol Microbiol Scand 78, 529-549 (1970)

23. DILLARD G.H.L., BRECHER G., CRONKITE E.P.
Separation, Concentration, and Transfusion of Platelets
Proc Soc Exp Biol Med 78, 796-799 (1951)

24. DJERASSI I., FARBER S., EVANS A.E.
Transfusion of Fresh Platelet Concentrates to Patients With Secondary Thrombocytopenia
N Engl J Med 268, 221-226 (1963)

25. DJERASSI I., KIM J.S., MITRAKUL C., SUVANSRI U. CIESIELKA W.
Filtration Leukopheresis For Separation And Concentration of Transfusable Amounts of Normal Human Granulocytes
J Med 1, 358-364 (1970)

26. DUKE W.W.
The Relation of Blood Platelets to Hemorrhagic Disease. Description of a Method for Determining the Bleeding Time and Coagulation Time and Report of Three Cases of Hemorrhagic Disease Relieved by Transfusion
J Am Med Assoc 55, 1185-1192 (1910)

27. DUQUESNOY R.J., FILIP D.J., RODEY G.E., ASTER R.H.
Transfusion Therapy of Refractory Thrombocytopenic Patients With Platelets From Donors Selectively Mismatched for Cross-reactive HLA Antigens
Transplant Proc 9, Suppl 1, 221-224 (1977)

28. DUQUESNOY R.J., FILIP D.J., TOMASULO P.A., ASTER R.H.
Role of HLA-C Matching in Histocompatible Platelet Transfusion Therapy of Alloimmunized Thrombocytopenic Patients
Transplant Proc 9, 1827-1828 (1977)

29. DUQUESNOY R.J., TESTIN J., ASTER R.H.
Variable Expression of w4 and w6 on Platelets. Possible Relevance to Platelet Transfusion Therapy of Alloimmunized Thrombocytopenic Patients
Transplant Proc 9, 1829-1831 (1977)

30. DUQUESNOY R.J., FILIP D.J., ASTER R.H.,
Influence of HLA-A2 on the Effectiveness of Platelet Transfusions in Alloimmunized Thrombocytopenic Patients
Blood 50, 407-412 (1977)

31. DUTCHER J.P., SCHIFFER C.A., AISNER J., WIERNIK P.H.
Alloimmunization Following Platelet Transfusion. The Absence of a Dose-Response Relationship
Blood 57, 395-398 (1981)

32. FILIP D.J., DUQUESNOY R.J., ASTER R.H.,
Predictive Value of Cross-Matching for Transfusion of Platelet Concentrates to Alloimmunized Recipients
Am J Hematol 1, 471-479 (1976)

33. FREIREICH E.J.
Effectiveness of Platelet Transfusions in Leukemia and Aplastic Anemia
Transfusion 6, 50-54 (1966)

34. GAYDOS L.A., FREIREICH E.J., MANTEL N.
The Quantitative Relation Between Platelet Count and Hemorrhage in Patients With Acute Leukemia
N Engl J Med 266, 905-909 (1962)

35. GOLDSTEIN I.M., EYRE H.J., TERASAKI P.I., HENDERSON E.S., GRAW R.G.
Leukocyte Transfusions: Role of Leucocyte Alloantibodies in Determining Transfusion Response
Transfusion 11, 19-24 (1971)

36. GRAW R.G., HERZIG G.P., EISEL R.J., PERRY S.
Leucocyte and Platelet Collection From Normal Donors with the Continuous Flow Blood Cell Separator
Transfusion 11, 94-101 (1971)

37. GRAW R.G., HERZIG R.H., LANGSTON M.G., PERDUE S.T., TERASAKI P.I.
National Donor Registry and Computer Transfusion Programs for Platelet Transfusions
Transplant Proc 9, Suppl 1, 225-227 (1977)

38. GRUMET F.C., YANKEE R.A.
Long-term Platelet Support of Patients with Aplastic Anemia. Effect of Splenectomy and Steroid Therapy
Ann Intern Med 73, 1-7 (1970)

39. HERZIG R.H., HERZIG G.P., BULL M.I., DECTER J.A., LOHRMANN H.P., STOUT F.G., YANKEE R.A., GRAW R.G.
Correction of Poor Platelet Transfusion Responses with Leococyte-poor HLA-Matched Platelet Concentrates
Blood 46, 743-750 (1975)

40. HERZIG R.H., POPLACK D.G., YANKEE R.A.
Prolonged Granulocytopenia From Incompatible Platelet Transfusions
N Engl J Med 290, 1220-1223 (1974)

41. HILLER C., BISCHOFF M., SCHMIDT A., BENDER K.
Analysis of the HLA-ABC Linkage Disequilibrium. Decreasing Strength of Gametic Assoziation with Increasing Map Distance
Hum Genet 41, 301-312 (1978)

42. HUESTIS D.W., WHITHE R.F., PRICE M.J., IMMAN M.
Use of Hydroxyethyl Starch To Improve Granulocyte Collection in the Latham Blood Processor
Transfusion 15, 559-564 (1975)

43. JANDL J.H., ASTER R.H.
Increased Splenic Poolin- And the Pathogenesis of Hypersplenism
Am J Med Sci 253, 383-397 (1967)

44. JEANNET M.
Système HL-A et Transfusion Sanguine
Schweiz Med Wschr 105, 780-782 (1975)

45. KARLSON K.E., GARZON A.A., SHAFTAN G.W., CHU C.J.
Increased Blood Loss Assoziated With Administration of Certain Plasma Expanders: Dextran 75, Dextran 40, and Hydroxyethyl Starch
Surgery 62, 670-678 (1967)

46. KOEPKE J.A., PARKS W.M., GOEKEN J.A., KLEE G.G., STRAUSS R.G.
The Safety of Weekly Plateletpheresis. Effect on the Donors' Lymphocyte Population
Transfusion 21, 59-63 (1981)

47. KUNTZ B.M.E., WOLLENHAUPT H.J., BRÜSTER H.T.
HLA-Antibodies After Platelet Transfusion
in: Abstracts of the 20.Congress of the Deutsche Gesellschaft für Bluttransfusion und Immunhämatologie, Würzburg, April 27-30,1982
Blut 45, 60 (1982)

48. LANDSTEINER K.
Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes
Wien Klin Wschr 14, 1132-1134 (1901)

49. LANDSTEINER K., LEVINE P.
A New Agglutinable Factor Differentiating Individual Human Bloods
Proc Soc Exp Biol (N.Y.) 24, 600-602 (1927)

50. LANGDELL R.D., ADELSON E., FURTH F.W., CROSBY W.H.
Dextran and Prolonged Bleeding Time. Results of a Sixty-gram, One-liter Infusion Given to One Hundred Sixty-three Normal Human Subjects
JAMA 166, 346-351 (1958)

51. LASKA L.C., LIN A., KAHN R.A., McCULLOUGH J.
Donor Platelet Response And Product Qualitiy Assurance in Plateletpheresis
Transfusion 7, 247-260 (1981)

52. LEEUWEN A.VAN, SCHUIT H.R.E., VAN ROOD J.J.,
Typing for MLC(LD): II. The Selection of Nonstimulator Cells By MLC Inhibition Tests Using SD-Identical Cells (MISIS) And Fluorescence Antibody Studies
Transplant Proc 5, 1539-1542 (1973)

53. LEVIN R.H., FREIREICH E.J.
Effect of Storage up to 48 Hours on Response to Transfusion of Platelet Rich Plasma
Transfusion 4, 251-256 (1964)

54. LIEBERT M., ASTER R.H.
Expression of HLA-B12 on Platelets, on Lymphocytes and in Serum. A Quantitative Study
Tissue Antigens 9, 199-208 (1977)

55. LISTER T.A., YANKEE R.H.
Blood Component Therapy
Clin Haematol 7, 407-423 (1978)

56. LOHRMANN H.P., BULL M.I., DECTER J.A., YANKEE R.A., GRAW R.G.
Platelet Transfusions From HL-A Compatible Unrelated Donors to Alloimmunized Patients
Ann Intern Med 80, 9-14 (1974)

57. MAGUIRE L.C., HENRIKSEN R.A., STRAUSS R.G., GOEDKEN M.M., ECHTERNACH B., KOEPKE J.A., THOMPSON J.S.
Platelet Function in Donors Undergoing Intermittent-Flow Centrifugation Plateletpheresis or Leukapheresis
Transfusion 20, 549-554 (1980)

58. MAGUIRE L.C., HENRIKSEN R.A., STRAUSS R.G., STEIN M.N., GOEDKEN M.M., ECHTERNACH B., KOEPKE J.A., THOMPSON J.S.
Function and Morphology of Platelets Produced for Transfusion by Intermittent-Flow Centrifugation Plateletpheresis or Combined Platelet-Leukapheresis
Transfusion 21, 118-122 (1981)

59. MAYR W.R.
Berechnung der Vaterschaftsausschlusschance und der Vaterschaftswahrscheinlichkeit im HLA-System
Z Rechtsmed 79, 87-95 (1977)

60. MAYR W.R.
Grundlagen zur Berechnung der Vaterschafts-wahrscheinlichkeit im HL-A System
Z Immun Forsch exp Ther 144, 18-27 (1972)

61. MAYR W.R.
HL-A-Phänotypen-, Gen- und Haplotypenfrequenzen in der Wiener Bevölkerung
Wien Klin Wschr 87, 488-492 (1975)

62. MIELKE C.H., KANESHIRO M.M., MAHER I.A.
The Standardized Normal Ivy Bleeding Time And its Prolongation By Aspirin
Blood 34, 204-215 (1969)

63. MITTAL K.K., RUDER E.A., GREEN D.
Matching of Histocompatibility (HL-A) Antigens for Platelet Transfusion
Blood 47, 31-41 (1976)

64. MUELLER-ECKHARDT C.
Histokompatibilität und Thrombozytentransfusion
Blut 34, 261-270 (1977)

65. MURPHY S., GARDNER F.H.
Platelet Preservation. Effect of Storage Temperature On Maintenance of Platelet Viability - Deletious Effect of Refrigerated Storage
N Engl J Med 280, 1094-1098 (1969)

66. NUSBACHER J., McCULLOUGH J., HUESTIS D.W.
Granulocyte Collection And Processing
in: The Granulocyte - Function and Clinical Utilization, pp. 175-183, New York 1977

67. NUSBACHER J., SCHER M.L., MACPHERSON J.L.
Plateletpheresis Using the Haemonetics Model 30 Cell Separator
Vox Sang 33, 9-15 (1977)

68. OPELZ I., MICKEY M.R., TERASAKI P.I.
Unrelated Donors for Bone-Marrow Transplantation and Transfusion Support. Pool Sizes Required
Transplant Proc 4, 405-409 (1974)

69. PAYNE R., TRIPP M., WEIGLE J., BODMER W., BODMER J.
A New Leucocyte Iso-Antigen System in Man
Cold Spr Harb Symp quant Biol 29, 285-295 (1964)

70. RYDER L.P., SVEJGAARD A., ANDERSEN E., SCHACHT E.
Assoziations Between HLA and Disease
Copenhagen, Compactas, 1976

71. SAUERBRUCH F.
Eine einfache Technik der arterio-venösen Bluttransfusion
Münch Med Wschr 62, 1545 (1915)

72. SLICHTER C.A., AISNER J., DALY P.A., SCHIMPF S.C., WIERNIK P.H.
Alloimmunization Following Prophylactic Granulocyte Transfusion
Blood 54, 766-774 (1979)

73. SHULMAN N.R., MARDER V.J., HILLER M.C., COLLIER E.M.
Platelet and Leukocyte Isoantigens and Their Antibodies: Serologic, Physiologic and Clinical Studies
Progr Hematol 4, 222-304 (1964)

74. SINTNICOLAASK K., SIZOO W., HAIJE W.G., ABEL J., VRIESENDORP H.M., STENFERT KROESE W.F., HOP W.C.J., LÖWENBERG B.
Delayed Alloimmunization by Random Single Donor Platelet Transfusion
Lancet 750-753 (1981)

75. SLICHTER S.J.
Controversies in Platelet Transfusion Therapy
Ann Rev Med 31, 509-540 (1980)

76. SLICHTER S.J.
Efficacy of Platelets Collected by Semi-Continuous Flow Centrifugation (Haemonetics Model 30)
Br J Haematol 38, 131-140 (1978)

77. SLICHTER S.J., HARKER L.A.
Thrombocytopenia: Mechanisms and Management of Defects in Platelet Production
Clin Haematol 7, 523-529 (1978)

78. STRAUSS R.G., GOEDKEN M.M., MAGUIRE L.C., KOEPKE J.A., THOMPSON J.S.
Combined Platelet-Leukapheresis: A Technique For Preparing Separate Platelet And Granulocyte-Platelet Units From Single Donors
Transfusion 19, 206-209 (1979)

79. STRAUSS R.G., MAGUIRE L.C., KOEPKE J.A., THOMPSON J.S.
Effect of Inermittent-Flow Centrifugation Leukapheresis On Donor Leucocyte Counts
Acta Haematol (Basel) 63, 128-131 (1980)

80. STUTE R., TROBISCH H., KUNTZ B.M.E., BRÜSTER H.T.
Untersuchungen über das Hepatitis-B-Oberflächenantigen im Radioimmunoassay
Lab Med 3, 45 (1979)

81. SVEJGAARD A.
HLA Factors and Immune Function
Acta Endocrinol (Suppl) (Copenhagen) 83, Suppl 205, 77-83 (1976)

82. SVEJGAARD A., KISSMEYER-NIELSEN F., THORSBY E.
HL-A Typing of Platelets
In: Histocompatibility Testing 1970, p. 160
Copenhagen, Munksgaard, 1970

83. SZYMANSKI I.O., PATTI K., KLIMAN A.
Efficacy of the Latham Blood Processor to Perform Plateletpheresis
Transfusion 13, 405-411 (1973)

84. TEJADA F., BIAS L.O.B., SANTOS G.W., ZIEVE P.D.,
Immunologic Response of Patients With Acute Leukemia to Platelet Transfusions
Blood 42, 405-412 (1973)

85. TERASAKI P.I., McCLELLAND J.D.
Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins
Nature 204, 998-1000 (1964)

86. THOMAS E.D., STORB R., CLIFT R.A., FEFER A., JOHNASON F.L., NEIMAN P.E., LERNER K.G., GLUCKSBERG H., BUCKNER C.T.
Bone Marrow Transplantation
New Engl J Med 292, 832-843 u. 895-902 (1975)

87. THOMPSON W.L., GADSDEN R.H.
Prolonged Bleeding Times and Hyperfibrinogenemia in Dogs After Infusion of Hydroxyethyl Starch and Dextran
Transfusion 5, 440-446 (1965)

88. TULLIS J.L., TINCH R.J., BAUDANZA P.
Plateletpheresis in a Disposable System
Transfusion 11, 368-377 (1971)

89. VAN ROOD J.J.
Leucocyte Grouping. A Method and its Application
Pasmans, Haag, 1962

90. VAN ROOD J.J.
Leucocyte Grouping
Thesis, Leiden, 1962

91. VAN ROOD J.J., VAN LEEUWEN A., KEUNING J.J., BLUSSE VAN OUD ALBLAS A.
The Serological Recognition of the Human MLC Determinants Using A Modified Cytotoxicity Technique
Tissue Antigens 5, 73-79 (1975)

92. VAN ROOD J.J., VAN LEEUWEN A., PLOEM J.S.
Simultaneous Detection of Two Cell Populations by Two-colour Fluorescence And Application to the Recognition of B-Cell Determinants
Nature 262, 795-797 (1976)

93. VAN ROOD J.J., VAN LEEUWEN A., SCHIPPERS H.M.A., CEPPELLINI R., MATTIUZ P.L., CURTONI S.
Leucocyte Groups And Their Relation To Homotransplantation
Ann NY Acad Sci 129, 467 (1966)

94. YANKEE R.A., GRAFF K.S., DOWLING R., HENDERSON E.S.
Selection of Unrelated Compatible Platelet Donors by Lymphocyte HL-A Matching
N Engl J Med 285, 760-764 (1973)

95. YANKEE R.A., GRUMET F.C., ROGENTINE G.N.
Platelet Transfusion Therapy. The Selection of Compatible Platelet Donors for Refractory Patients by Lymphocyte HL-A Typing
N Engl J Med 281, 1208-1212 (1969)

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Brüster
für die Überlassung des Themas, die väterliche
Betreuung und sein großzügiges Gewährenlassen
im Detail.

Mein besonderer Dank gilt Frau Akad.Rätin Dr. Ku
für Ihre Anleitung, stete Gesprächsbereitschaft
und viele hilfreiche Ratschläge.

Schließlich danke ich Herrn MTA Swoboda für
technische Hinweise bei den Versuchen.

Lebenslauf

Ich wurde am 4.Juni 1957 in Neuss a.Rh. als Sohn des Karl-Heinz Wollenhaupt und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Abstoß, geboren.
Von 1964 bis 1967 besuchte ich die Kath. Volksschule Hl. Dreikönige, Neuss. 1967 wechselte ich zum Quirinus-Gymnasium, Neuss, und legte dort im Juni 1976 die Reifeprüfung ab.

In der Zeit von Oktober 1976 bis März 1977 leistete ich einen ersten Teil meines Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr.

Zum Sommersemester 1977 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf auf. Im Frühjahr 1979 legte ich die Ärztliche Vorprüfung, im Frühjahr 1980 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Seit dem Bestehen des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung im Frühjahr 1982 bin ich im Praktischen Jahr an den Städtischen Krankenanstalten Krefeld tätig.